VISIT…

LANZAROTE Caliente.COM

Практическая химия белка

Редактор А. Дарбре

Перевод с английского

канд. хим. наук Н. А. Алдановой,
канд. хим. наук И. В. Назимова
и канд. хим. наук П. Д. Решетова



Москва «Мир» 1989

Practical Protein Chemistry
A Handbook

Edited by

A. DARBRE

Department of Biochemistry
King's College London

A Wiley — Interscience Publication

JOHN WILEY & SONS

Chichester · New York · Brisbane · Toronto · Singapore

Практическая химия белка

Редактор А. Дарбре

Перевод с английского

канд. хим. наук Н. А. Алдановой,
канд. хим. наук И. В. Назимова
и канд. хим. наук П. Д. Решетова



Москва «Мир» 1989

ББК 24.239
П69
УДК 547.9+541.57

Практическая химия белка: Пер. с англ./Под ред.
П69 А. Дарбре. — М.: Мир, 1989. — 623 с., ил.

ISBN 5-03-001031-9

Учебное издание, объединяющее все новейшие методические разработки в исследованиях первичной структуры белков, а также традиционные методы, широко используемые в исследовательской практике. Авторы книги (из США, Великобритании и др. стран) известны как крупные ученые, виртуозно владеющие современной методологией исследования белков. В каждом разделе приводятся краткое объяснение химии процесса и подробная экспериментальная методика с ссылкой на оригинальную работу.

Для исследователей, особенно тех, кто только начинает работать в области современной физико-химической биологии, для аспирантов и студентов.

П $\frac{1903010000\text{-}246}{041(01)\text{-}89}$ **99—89, ч. 1** **ББК 24.239**

Редакция литературы по химии

ISBN 5-03-001031-9 (русск.)
ISBN 0-471-90673-5 (англ.)

© by John Wiley & Sons Ltd. 1986.
Reprinted April 1987.
All rights reserved.
This book was originally published in the English language by John Wiley & Sons Ltd.
© **перевод на русский язык, «Мир», 1989**

ОТ ПЕРЕВОДЧИКОВ

Необходимым этапом исследований механизмов биохимических процессов, происходящих с участием белков, является выделение белковых компонентов в индивидуальном состоянии и установление их структуры. Этот этап работы трудоемок и требует от экспериментатора большого опыта, интуиции и совершенного владения техникой эксперимента. Общее направление и темпы развития структурной химии белка, пожалуй в большей степени, чем для других классов органических соединений, отражали состояние методического потенциала своего времени.

Классическая химия белка, накопив большой практический опыт, заложила фундамент для проведения структурных исследований. Бурный прогресс, достигнутый в этой области в последнее десятилетие, в значительной степени обусловлен стремительным ростом уровня методических разработок, в частности благодаря внедрению высокоэффективной жидкостной хроматографии и полностью автоматизированных методов секвенирования. Богатейший методический арсенал современной аналитической химии белка позволил подойти к изучению на субмикроуровне сложных и труднодоступных белковых систем.

Ежегодно в мире издается значительное число обзоров и монографий, посвященных методическим аспектам структурного анализа белков. Однако потребность в такого рода литературе непрерывно возрастает параллельно с ростом объема информации, выходящей за пределы уже имеющихся изданий.

Предлагаемая вниманию читателей книга создана коллективом авторов, имеющих многолетний опыт работы в данной области и внесших существенный вклад в развитие методов аналитической химии белка. В книге рассмотрены все этапы структурного исследования белка: от выделения и описания очистки до физико-химических методов определения третичной структуры.

Материал книги хорошо сбалансирован, достойное место отведено как традиционным, уже зарекомендовавшим себя мето-

дам, так и новейшим приемам анализа. Каждая глава отражает индивидуальный стиль ее автора и в какой-то степени его пристрастие к методикам и приборам, используемым в конкретной лаборатории, но при этом сохраняется общий принцип изложения материала: вначале даются теоретические основы рассматриваемого метода, а затем описание его применения на практике с указанием тонких экспериментальных подробностей. Каждая глава снабжена подробным списком цитируемых работ.

Все это в совокупности делает книгу очень полезным пособием как для начинающего исследователя, так и для уже имеющего практический опыт работы в области структурной химии белка.

Перевод книги осуществлен по инициативе академика Ю. А. Овчинникова, который в своей рекомендации писал: «Знание практических аспектов белковой химии сегодня необходимо не только химикам-белковикам, но и многим другим специалистам, работающим в разных областях биологии. Особенность современного этапа развития химии белка состоит в том, что арсенал имеющихся здесь методических подходов необычайно широк и разнообразен и нередко исследователь бывает поставлен перед необходимостью нелегкого выбора тех из них, которые лучше всего подходили бы для решения данной конкретной задачи». Мы надеемся, что книга поможет сделать этот выбор и провести планируемое исследование на высоком методическом уровне.

Книга может представлять интерес для исследователей в области современной биологии и биохимии, а также как учебное пособие для аспирантов и студентов.

В переводе гл. 19, 20 и 21 принимали участие канд. хим. наук Б. В. Розынов, канд. хим. наук В. В. Демин и канд. хим. наук П. В. Костецкий.

Н. Алданова
И. Назимов
П. Решетов

Хейзел и Филиппе посвящается

ПРЕДИСЛОВИЕ

Идея создания этой книги родилась в результате собственных трудоемких и временами бесплодных поисков литературы по аналитическим методам химии белка. Известны серийные издания на эту тему, изобилующие практическими подробностями, такие, как Methods in Enzymology и Methods of Biochemical Analysis. Однако обсуждение с коллегами показало, что существует необходимость объединить в краткой форме всю известную к настоящему времени информацию в одном издании. Мы не ставили целью включить в книгу абсолютно все химические методы изучения белков; например, синтез пептидов в растворе или на твердой фазе по Меррифильду, а также методы химической модификации белков достаточно подробно рассмотрены в других публикациях. Поэтому читатель может обнаружить, что какой-то его излюбленный метод в этой книге оказался пропущенным. Редактор заранее искренне сожалеет о таком упущении, но вместе с тем считает необходимым заметить, что авторы сознательно ограничились описанием наиболее известных и наиболее освоенных на практике методов. Включение материала последних трех глав имело своей целью удовлетворить более широкие интересы специалистов, работающих в этой области.

Достигнутые за последний весьма короткий период огромные успехи в секвенировании нуклеотидов, по-видимому, должны служить признаком того, что секвенирование белков, возможно, уходит в прошлое, если вообще не станет излишним. Фактически именно так ставится вопрос в статье «Закат и упадок химии белка?» [8], опубликованной недавно в журнале Nature. В связи с идеей о мозаичной организации эукариотической ДНК, включающей «экзоны» и «интроны» [3], потребовался анализ соответствующих аминокислотных последовательностей. Когда белковые структуры были определены, стала очевидной роль рекомбинаций экзонов в эволюции белков [2]. Данные относительно посттрансляционной модификации белков, о сигнальных пре- и пропептидных последовательностях свидетельствуют

о том, что секвенирование белков не остановилось в своем развитии и для решения этой задачи по-прежнему необходимы разнообразные подходы и методы. Биотехнология имеет дело с техникой рекомбинантных ДНК, но все манипуляции с генетическим материалом имеют своей конечной целью создание специфических белков и пептидов, которые должны быть идентифицированы специалистами в области химии белка.

Изучение физиологически активных пептидов, антибиотиков, ферментов, структурных белков, рецепторных взаимодействий типа гормон — белок и белок — белок, эволюционных взаимосвязей и недавно открытой гомологии первичной структуры между некоторыми онкогенами и нормальными белками — все эти достижения открывают для исследователей вдохновляющую перспективу. Таким образом, в работу с белками все более и более вовлекаются специалисты в различных областях биологической науки. О методологии химии белка опубликован столь обширный материал, что начинающий исследователь может испытывать затруднения: «С чего начать?».

Все авторы книги активно работают в разных областях химии белка. Они стремились должным образом ориентировать читателя, изложив краткое введение в обсуждаемую проблему и практические детали выполнения эксперимента, которые по их собственному опыту дают удовлетворительные результаты. Несомненно, многие методы прошли проверку практикой и временем, такие, например, как исчерпывающий гидролиз белков 6 М HCl или колориметрическое определение белков по Лоури [7]; вместе с тем созданы новые методы, которые в определенном отношении обладают неоспоримыми преимуществами.

Во время подготовки этой книги было получено известие о трагической смерти одного из авторов — д-ра Э. Гросса (1928—1981). Мы все многим обязаны ему за неоценимый вклад в химию белка. Большое сожаление в связи с потерей талантливого ученого и друга выразил его соавтор по работе над книгой А. Фонтана. Статья о научном пути Э. Гросса была опубликована К. Бирром [1]. Не менее трагически воспринята нами кончина С. Мура, который внес большой личный вклад в подготовку этого издания. Воспоминания о работе с С. Муром [4] и статьи, посвященные его памяти, опубликованы в соответствующем выпуске журнала Analytical Biochemistry [6]; памяти С. Мура и В. Г. Штейна посвящен один из томов Methods in Enzymology [5].

В заключение я хочу выразить благодарность всем авторам за вложенный ими громадный труд. Выражаю признательность М. Уотерфилду за ценные советы и хочу особо отметить, что время, которое он отдавал этой работе, было поистине огромно. Нельзя с благодарностью не вспомнить также энтузиазм

П. Уильямса из издательства Heyden Press и помощь, оказанную при подготовке книги к публикации.

Лондонский Королевский колледж, 1985

А. Дарбре

Литература

1. *Birr C.*, Int. J. Peptide Prot. Res., **21**, 1—2 (1983).
2. *Blake C.*, Trends Biochem. Sci., **8**, 11—13 (1983).
3. *Gilbert W.*, Nature (Lond.), **271**, 501 (1978).
4. *Hirs C. H. W.*, Anal. Biochem., **136**, 3—6 (1984).
5. *Hirs C. H. W., Timasheff S. N.* (Eds.), Methods Enzymol., **91**, 1—693 (1983).
6. *Kaplan N. O., MsElroy W. D.*, Anal. Biochem., **136**, 1 (1984).
7. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.*, J. Biol. Chem., **193**, 265—275 (1951).
8. *Malcolm A. D. B.*, Nature (Lond.), **275**, 90—91 (1978).

ВМЕСТО ВВЕДЕНИЯ

Я не перестаю испытывать чувство удовлетворения в связи с инициативой доктора Дарбре, собравшего группу авторов с тем, чтобы объединить в одном издании всю методологию аналитической химии белка. Это мероприятие представляется тем более своевременным, что благодаря появлению генной инженерии вообще и белковой инженерии в частности существенным образом возрастает роль специалистов в области химии белка. Конечно, теперь вполне очевидно, что наиболее эффективный способ определения аминокислотной последовательности основан на секвенировании ДНК клонированного гена, или клонированной ДНК (кДНК). А наиболее быстрый и надежный путь клонирования заключается в скрининге банков генов или кДНК с помощью олигонуклеотидных зондов с минимальной вырожденностью, синтезированных на основе тщательно отобранных пептидных фрагментов. Кроме того, лишь немногие гены экспрессируются напрямую, без посттрансляционного процессинга, только в результате протеолиза и/или модификации боковых цепей аминокислот; следовательно, специалист должен уметь находить признаки модификации и процессинга в природном продукте. И даже в том случае, если это не преследует глубокую научную цель, просто приятно «иметь в руках» пептидные фрагменты, соответствующие включенной в ДНК кодирующей последовательности.

Для многих из нас, свидетелей первых шагов молекулярной биологии, белковая инженерия символизирует ту вершину сотрудничества, к которому стремились молекулярные генетики, специалисты в области химии белка и кристаллографы. Схема на рис. 1 дает общее представление о путях сотрудничества между химиком и специалистом в области генной инженерии, а схема на рис. 2 отражает направления, на которых химик работает в союзе с кристаллографом. Совместно такой коллектив может взяться за расшифровку закономерностей свертывания полипептидной цепи или механизма ферментативного катализа, в результате чего в один прекрасный день станет возможным теоретически транслировать структуру гена в первичную, а затем в третичную структуру белка и даже предсказать каталитические свойства конечного продукта.

Однако сегодня даже талантливый ученый, работающий в области химии белка, вдохновленный открывающимися перспективами, сталкивается с рядом проблем, чем-то напоминающих «средневековье» белковой химии, когда отсутствовали ме-

тоды расщепления пептидов, методы очистки и секвенирования и, следовательно, каждый был вынужден изобретать свои собственные приемы. Сегодня изобилие методов производит почти устрашающее впечатление, в то время как исследователь должен отобрать для работы только те из них, которые наиболее всего подходят для решения конкретной проблемы. В некоторой степени именно это обстоятельство уменьшает приток в эту область молодых ученых.

Литературные данные свидетельствуют о том, что сегодня секвенирование белков проводят с помощью автоматизированных систем, которыми управляют технические специалисты, обученные обращению с вакуумными линиями. Специалист в области химии белка убежден (и в этом есть некоторая доля истины), что его научный интерес должен лежать несколько в иной области, а именно в глубоком понимании химии аминокислот и предсказании изменения их свойств при тех пертурбациях, которые сопровождают свертывание полипептидной цепи. Для такого ученого представляет эстетическое удовлетворе-

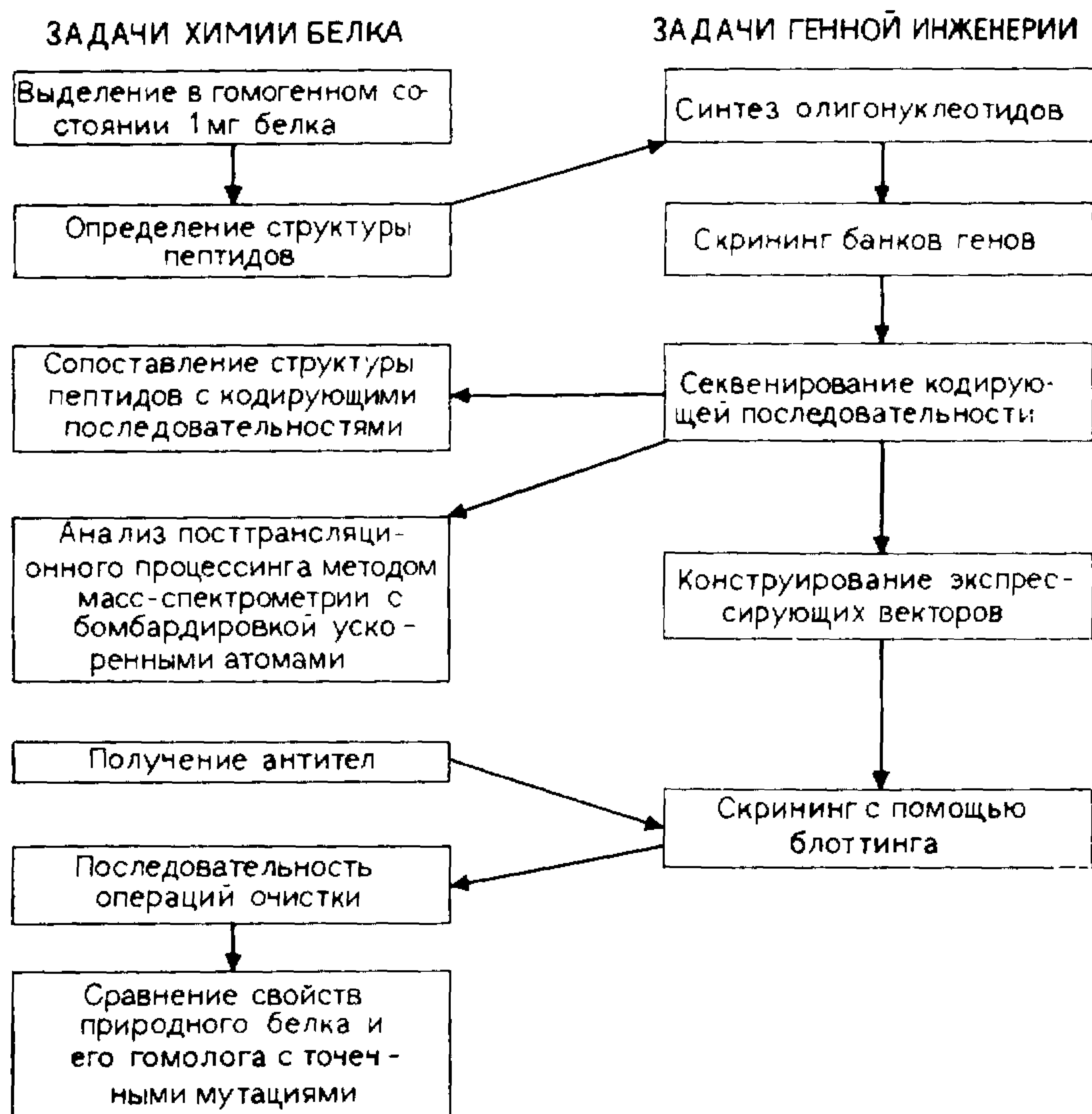


РИС. 1.

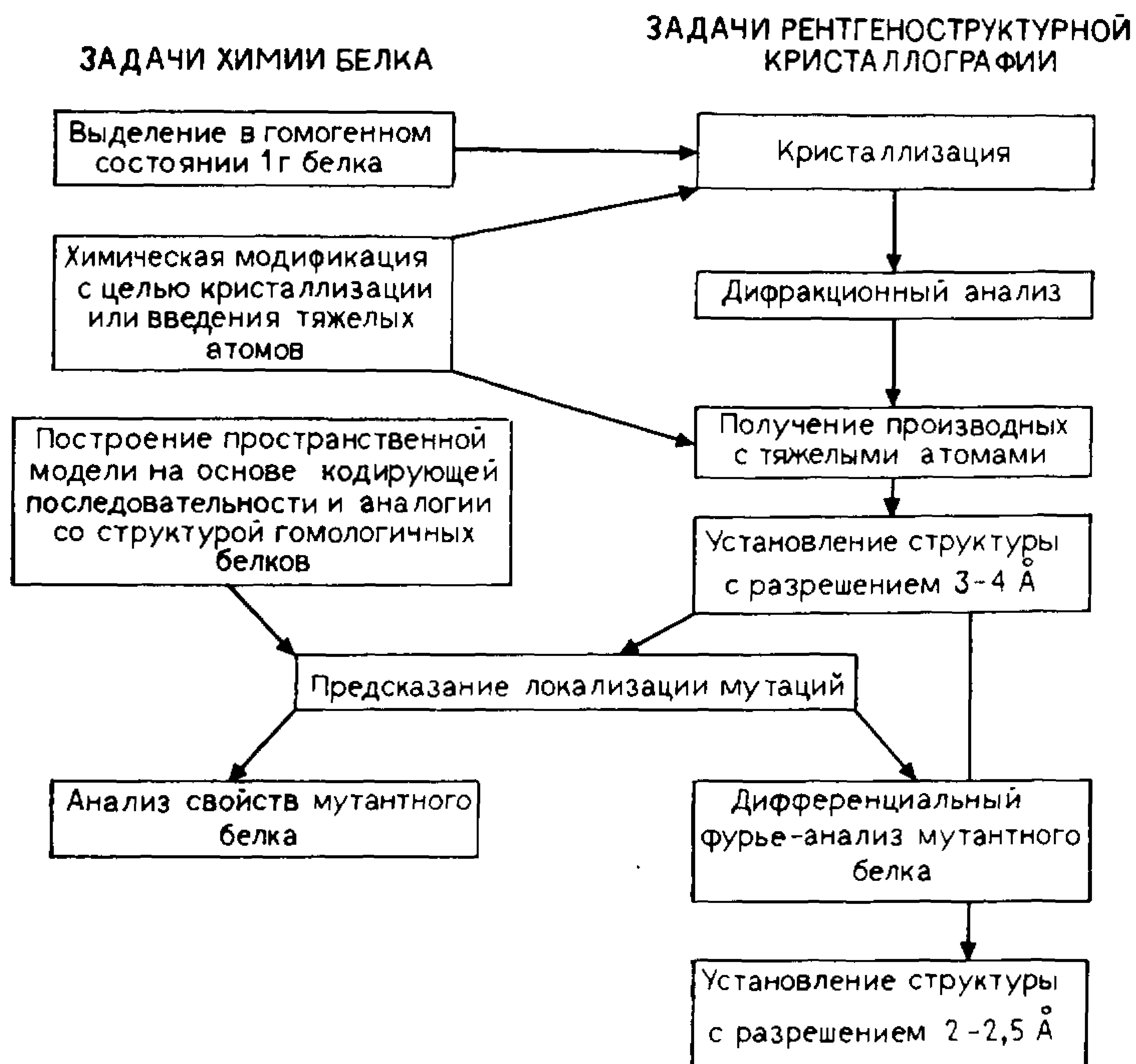


РИС. 2.

ние поставить простой, но элегантный эксперимент с целью решить конкретную проблему, а автоматические анализаторы, секвенаторы и масс-спектрометры, хотя и являются необходимым атрибутом его деятельности, по существу играют роль всего лишь средства для решения научных задач.

В конце концов появление этой книги должно вызвать одобрение специалистов, так как наряду с неизбежным изобилием подробных «рецептов» в нее включены дельные советы. Но главную ценность книга, по-видимому, будет иметь для биохимика широкого профиля, перед которым вдруг возникает необходимость поработать в белковой химии, а для этого ему надо иметь единственный Вадемекум*, которого до настоящего времени не было. Теперь он его имеет.

Директор Центра биотехнологии,
Королевский колледж науки и технологии, Лондон

Б. С. Хартли

---

* Вадемекум — от *лат.* Vade mecum, что значит «иди за мной». Это принятое название справочников и путеводителей, в особенности малого формата. — *Прим. перев.*

НЕКОТОРЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ, ПРИНЯТЫЕ В КНИГЕ

АПС — аминопропилстекло
β-АПС — β-N-аминоэтил-(3-аминопропил)стекло
АТЗ — 2-анилино-5-тиазолинон
БЖХБ — быстрая жидкостная хроматография белков
БСА — бычий сывороточный альбумин
БТИ — бис-(1,1-трифтороацетокси)иодобензол
БУВП — бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭТТ — высота, эквивалентная теоретической тарелке
ГЖХ — газожидкостная хроматография
ГФ — газофазный
ГФМК — гептафторомасляная кислота
ДАБИТЦ — 4-диметиламиноазобензол-4′-изотиоцианат
ДАБТГ — 4-диметиламиноазобензол-4′-тиогидантоин
ДГПАЭ — 2-(гидроксипропил)аминоэтил
ДИТЦ — *п*-фенилендиизотиоцианат
ДМАА — диметилаллиламин
ДМБА — диметилбензиламин
ДМСО — диметилсульфоксид
ДМФА — диметилформамид
ДНС — 5-диметиламинонафталин-1-сульфонил
ДНФ — динитрофенил
ДОХ — дезоксихолат натрия
ДСН — додецилсульфат натрия
ДТНБ — 5,5′-дитиобис(2-нитробензойная кислота) — реагент Эллмана
ДТТ — дитиотреит
ДЦК — дициклогексилкарбодиимид
ДФФ — диизопропилфторофосфат
ДЭАЭ — диэтиламиноэтил
ед. опт. плотн. — единицы оптической плотности
ЖФ — жидкофазный
ИО-ВЭЖХ — ионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография
квадрол — N,N,N′,N′-тетракис-(2-гидроксипропил)этилендиамин

КМ — карбоксиметил
МИТЦ — метилизотиоцианат
НБФ — 4-хлоро-7-нитробензофуран
НММ — N-метилморфолин
НТБ — 2-нитро-5-тиобензоат
НТСБ — 2-нитро-5-тиосульфобензоат
НТЦБ — 2-нитро-5-тиоцианобензоат
НЭМ — N-этилморфолин
ОФА — *о*-фталевый альдегид
ОФ-ВЭЖХ — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
ПААГ — полиакриламидный гель
ПМК — пиромеллитовая кислота
полибрен — 1,5-диметил-1,5-диазаундекаметиленполиметобромид
ПФБ-Br — 2-бромо-2,3,4,5,6-пентафторотолуол
СП — сульфопропил
ТГФ — тетрагидрофуран
ТЕМЕД — тетраметилендиамин
ТМА — триметиламин
ТНБС — 2,4,6-тринитробензолсульфокислота
ТНФ — 2,4,6-тринитрофенил
трис — трис-(гидроксиметил)аминометан
ТФ — твердофазный
ТФК — L-(1-тозиламидо-2-фенил)этилхлорометилкетон
ТФУ — трифтороуксусная кислота
ТЭА — триэтиламин
ТЭТА — триэтилентетрамин
ФИТЦ — фенилизотиоцианат
ФМСФ — фенилметилсульфонилфторид
ФТГ — фенилтиогидантоин
ФТК — фенилтиокарбамоил
Ф — фосфо
ЭДК — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

BOC — *трет*-бутилоксикарбонил
BNPS-скатол — 2-(2-нитрофенилсульфенил)3-метил-3-бромоиндоленин
CPG — стекло с контролируемым размером пор
HNBBr — 2-гидрокси-5-нитробензилбромид
HOBt — 1-гидроксибензотриазол
HOSu — 1-гидроксисукцинимид
NBS — N-бромосукцинимид

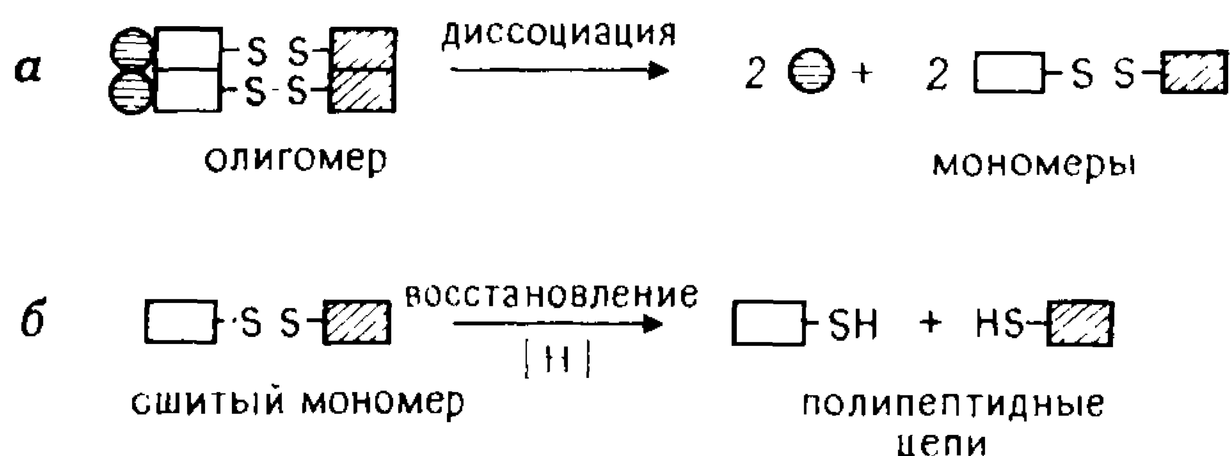
Глава 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА БЕЛКОВЫХ ОЛИГОМЕРОВ. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОМЕРОВ И ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Р. К. МАРШЕЛЛ, А. С. ИНГЛИС (R. C. MARSHALL, A. S. INGLIS, *Division of Protein Chemistry, CSIRO, 343 Royal Parade, Parkville, 3052 Victoria, Australia*)

1.1. Введение

В настоящей главе главным образом обсуждаются применяемые на практике методы определения состава белковых олигомеров, способы идентификации и разделения мономеров, а также методы выделения отдельных полипептидных цепей. Как известно, молекула олигомерного белка построена из нековалентно связанных мономеров (субъединиц), которые в свою очередь могут включать несколько полипептидных цепей, соединенных дисульфидными мостиками (или другим типом ковалентной связи). Например, тетрамер, составленный из двух пар различных мономеров, один из которых содержит две полипептидные цепи, можно схематически представить следующим образом:



Описанные в главе методы могут быть использованы для оценки стехиометрического состава олигомеров. В свою очередь данные об относительном количестве мономеров в олигомере, их молекулярной массе и свойствах дают полезную предварительную информацию о третичной и четвертичной структурах олигомера. Однако рассмотрение закономерностей (и симметрии) структурной организации сложных олигомеров не входит в задачу данной главы [131]. Дополнительную информацию читатель может найти в специальных обзорах, посвященных четвертичной структуре белков [93], белок-белковым взаимодействиям [62], методам определения субъединичной структуры [173].

Поскольку методы идентификации мономеров и отдельных фрагментов олигомеров входят как составная часть в структур-

ный анализ олигомеров, вполне возможно, что излагаемый здесь материал может частично дублироваться в других главах. Описанные в главе методы эксперимента рекомендованы читателю на основании личного опыта авторов и их коллег с учетом того, что для их осуществления требуются небольшие материальные затраты, а также того, что методики хорошо воспроизводятся. Сложным в техническом отношении методам, таким, например, как масс-спектрометрия, ультрацентрифугирование и рентгеноструктурный анализ, посвящены гл. 19 и 20. Дополнительную информацию можно найти также в специальных обзорах [4, 88, 93, 177].

Методы выделения и идентификации мономеров дают информацию о молекулярной массе олигомера и его субъединиц, их количестве и свойствах, позволяют получать препараты для определения первичной структуры. Если удается получить белок в виде кристаллов, изучение первичной структуры удобно вести параллельно с помощью секвенирования и физических методов (например, рентгеноструктурного анализа), поскольку сопоставление получаемой информации существенно ускоряет ход анализа [158]. Однако такая возможность представляется редко. Часто именно получение достаточно чистых препаратов белка или субъединиц, пригодных для проведения аминокислотного анализа, и составляет одну из главных проблем, поскольку исследуемый белок может присутствовать лишь в незначительных количествах в сложной смеси сопутствующих белков и продуктов их деградации или же исходная смесь может содержать белки с очень близкими свойствами. Если белок плохо растворим и требует более жестких условий для солюбилизации, гетерогенные препараты могут быть получены уже на начальном этапе выделения. Причиной появления гетерогенности может быть, по-видимому, изменение суммарного заряда из-за дезамидирования амидных групп аспарагина и глутамина, карбамилирование ε-аминогрупп некоторых остатков лизина ионом цианата, присутствующим в растворах мочевины [38], неспецифическая модификация остатков метионина и гистидина при алкилировании цистеина.

Причиной гетерогенности по молекулярной массе может быть расщепление лабильных пептидных связей, например неустойчивой в кислой среде, в частности в 80%-ной муравьиной кислоте, связи Asp-Pro [100]. Признаком такого гидролиза может послужить обнаружение N-концевого остатка пролина. Важным условием получения гомогенного белка является отсутствие в препарате примесей протеаз, поскольку в следовых количествах они вызывают ограниченный протеолиз по отдельным пептидным связям [91].

Относительно легко может осуществляться блокирование

α-аминогруппы N-концевого аминокислотного остатка, что делает невозможным секвенирование. Наиболее частыми причинами такой блокировки являются циклизация N-концевого остатка глутамина, карбамилирование α-аминогрупп в растворах мочевины, а также присутствие в реагентах следов альдегидов [54].

Указанных осложнений можно избежать, если тщательно соблюдать условия проведения реакций и придерживаться рекомендованных методик проведения экспериментов.

1.2. Методы идентификации олигомеров

Молекулярную массу интактного олигомера определяют в неденатурирующих условиях с помощью методов ультрацентрифугирования, гель-фильтрации и электрофореза в градиенте полиакриламидного геля (ПААГ). Устойчивость и растворимость большинства олигомерных белков зависит от ионной силы и pH буферного раствора. В отличие от электрофореза в ПААГ, где на состав буферных растворов накладываются определенные ограничения, в частности ионная сила не должна превышать 0,1, гель-фильтрацию можно вести в буферных растворах, стабилизирующих олигомер (например, в присутствии ионов металлов или кофакторов). Для определения молекулярной массы белков применяют классический вариант гель-фильтрации на сшитых декстранах, полиакриламиде или агарозе. В последнее время получены гели нового типа, позволяющие вести процесс при повышенном давлении, благодаря чему время анализа сокращается с 1—2 сут до 30 мин (гл. 6).

1.2.1. Электрофорез в градиенте ПААГ [5, 98, 112, 113]

Сущность метода состоит в том, что под действием электрического поля белковые зоны мигрируют в полиакриламидном геле с уменьшающимися размерами пор до некоторого конечного положения, обусловленного сопротивлением среды. Таким образом, расстояние, пройденное зоной белка, связано с молекулярной массой, которую можно определить путем сравнения с поведением белков-маркеров.

Хотя белки с небольшим суммарным зарядом имеют низкую электрофоретическую подвижность, конечное положение зон практически не зависит от величины заряда при условии, что все исследуемые белки имеют заряд одного знака, а pH буфера заметно отличается от их изоэлектрических точек.

1.2.1.1. Описание метода. Известно множество вариантов прибора для электрофореза в вертикальных или горизонтальных пластинах (блоках) полиакриламидного геля [24, 73, 142, 170]. Источник питания должен обеспечивать стабилизацию по напряжению и по току, наличие термостата в таких приборах необязательно.

В качестве пористой среды используются в основном полиакриламидные гели, полностью заменившие ранее применявшийся крахмал. Гель различной пористости (градиентный гель) готовят, варьируя соотношение и концентрацию мономеров — акриламида $CH_2{=}CHCONH_2$ и бифункционального N,N′-метиленбисакриламида $CH_2{=}CHCONHCH_2NHCOCH{=}CH_2$, выполняющего функцию сшивающего агента (разд. 1.3.1.1). *Следует помнить*, что акриламид — нейротоксичный яд. Некоторые исследователи полагают, что наилучшие результаты можно получить только при использовании мономеров, дополнительно очищенных путем перекристаллизации [35]. Однако вполне удовлетворительные результаты получаются при применении обычных коммерческих реактивов. Остальные реагенты должны иметь квалификацию «ч. д. а.».

Линейный градиент концентрации создают с помощью двух сообщающихся сосудов цилиндрической формы и перистальтического насоса или же с помощью градиентного смесителя иного, более сложного типа [113]. При недостатке опыта готовить градиентные гели высокого качества и с хорошей воспроизводимостью бывает затруднительно, в таких случаях можно воспользоваться готовыми пластинами (фирмы Gradipore, LKB, Pharmacia).

Белки с молярной массой 13 000—100 000 фракционируют в гелях с градиентом концентрации 4—30%, для белков с молярной массой 200 000—1 000 000 используют гель с градиентом 4—16%. Гель вначале уравновешивают рабочим буферным раствором. Для этого проводят предварительный электрофорез при 150 В в течение 1 ч.

Проведение электрофореза. Для приготовления запасного электродного буфера (трис — ЭДТА — борная кислота) растворяют в дистиллированной воде 121 г триса, 15,6 г ЭДТА (динатриевой соли) и 9,2 г борной кислоты, объем раствора доводят до 1 л. Перед употреблением запасной раствор разбавляют дистиллированной водой (1 : 10).

Образец белка растворяют или диализируют против разбавленного электродного буфера, содержащего бромофеноловый синий (0,1% масс./об.) и глицерин (10% масс./об.). В лунки с помощью микропипетки или микрошприца вносят 2—5 мкл раствора образца (с концентрацией 0,5 мкг/мкл). Электрофорез проводят при 150 В в течение 7—16 ч. Гель калибруют с по-

мощью белков-маркеров [93]. Наборы стандартных белков, поставляемых фирмой Pharmacia, представляют собой лиофильно высушенную смесь тироглобулина (*M* 669 000), ферритина (*M* 440 000), каталазы (*M* 232 000), лактатдегидрогеназы (*M* 140 000) и альбумина (*M* 67 000).

Окрашивание красителем кумасси ярко-голубой. По завершении электрофореза белковые зоны локализуют путем окрашивания красителем кумасси ярко-голубой, обозначаемый в литературе как CBB G 250. Для окрашивания гелей используют 0,15%-ный (масс./об.) раствор CBB G 250 в смеси метанол — ледяная уксусная кислота — вода (50 : 10 : 40). Для приготовления раствора красителя его вначале растворяют в метаноле, затем добавляют уксусную кислоту и воду, после чего раствор фильтруют. Для обесцвечивания геля, пластину выдерживают в течение 12 ч в смеси метанол — ледяная уксусная кислота — вода (5 : 7,5 : 87,5).

Обработку геля ведут в фотографической кювете, накрытой крышкой с целью уменьшить испарение метанола. Время от времени (примерно каждый час) кювету покачивают. Раствор красителя (его можно использовать до 20 раз) сливают в склянку с притертой пробкой и в кювету заливают раствор для обесцвечивания. Если раствор для отмывки не содержит поглощающих краситель материалов (отрезок шерстяной ткани размером 100×100 мм, губчатая резина, гранулы ионита), то раствор заменяют на свежий 2—3 раза в течение 24 ч. Хранят гель в 10%-ной уксусной кислоте. Разработан электрофоретический способ отмывки красителя, однако иногда такая отмывка сопровождается обесцвечиванием белковых зон.

Окрашивание растворами солей серебра. Наиболее чувствительный метод обнаружения белковых зон заключается в пропитывании геля раствором нитрата серебра; затем гель обрабатывают восстановителем и раствором соды. При этом комплексы полипептид — серебро обнаруживаются в виде черных полос. Проявления солями серебра можно проводить после окрашивания красителем кумасси, который предварительно отмывают смесью метанол — уксусная кислота [138]. Наборы реактивов для окрашивания гелей солями серебра выпускаются компаниями Upjohn (гелькод) и Bio-Rad. Оба набора повышают чувствительность обнаружения с помощью кумаси в 250 и 50 раз соответственно. Гелькод позволяет обнаруживать белки при содержании 5—10 нг [154]. Как оттенок, так и интенсивность окрашивания солями серебра зависят от свойства анализируемого белка. Это свойство можно использовать для контроля за выделением исследуемого белка из сложной смеси. (Относительно методов обнаружений в геле см. разд. 8.19.) Поскольку метод обладает высокой чувствительностью, необходимо очень

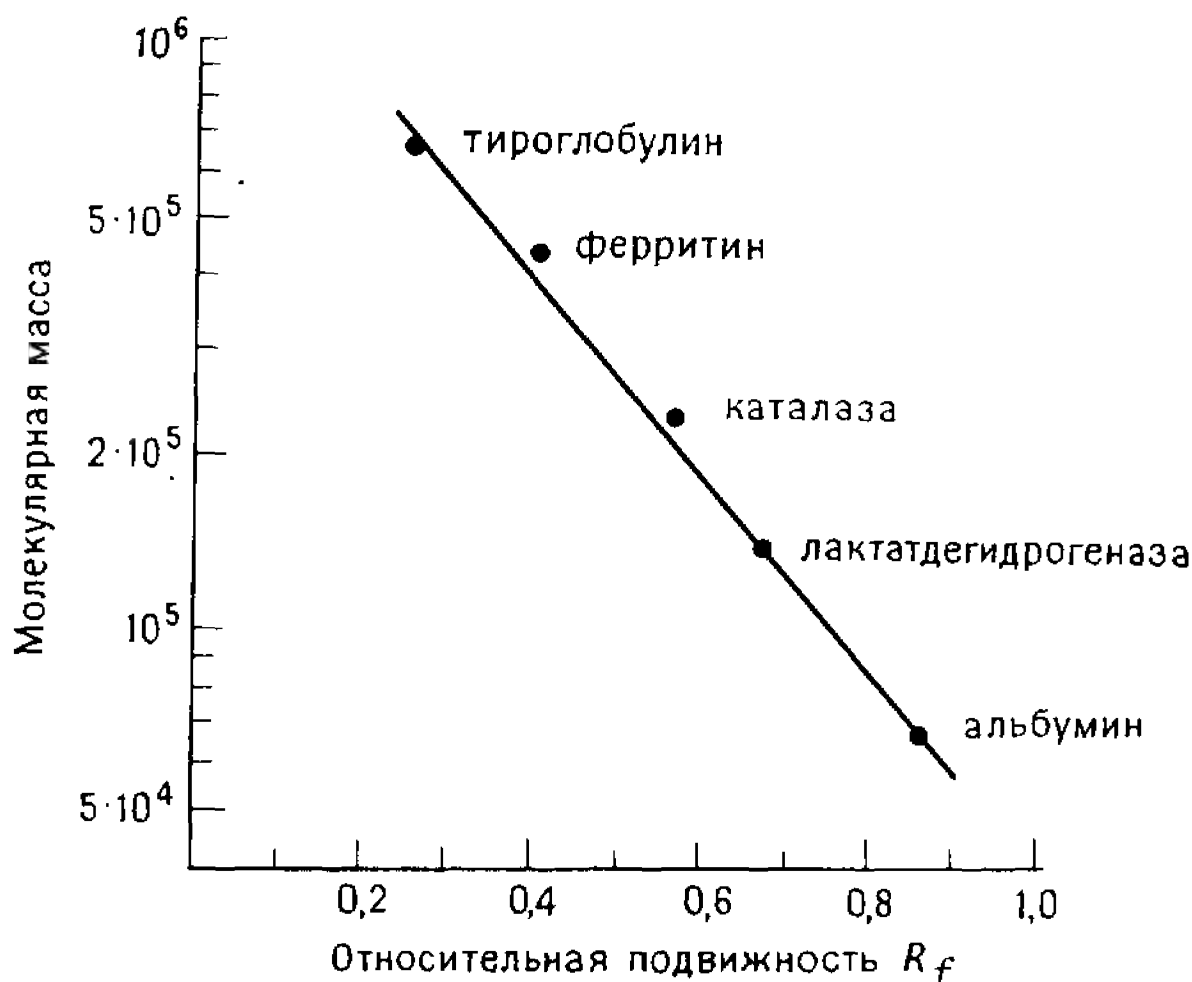


РИС. 1.1. Градуировочный график для градиентного (4—30%) ПААГ, построенный с использованием в качестве белков-маркеров тироглобулина, ферритина, каталазы, лактатдегидрогеназы и бычьего сывороточного альбумина [101].

тщательно отмывать стеклянные пластинки (разд. 8.2). Если гель неплотно прилегает к стеклу (из-за жировых пятен), возможно затекание образца в образующийся зазор.

Фотографирование полученных электрофореграмм. После прокрашивания готовые электрофореграммы фотографируют на цветную или высококонтрастную черно-белую негативную или позитивную пленку (Agfa Copek или Kodak Recordak). Обычно съемку ведут с желтым фильтром № 16, зоны слабой интенсивности снимают с оранжевым фильтром № 2, интенсивные зоны можно снимать без фильтра, экспозиция составляет 1—6 с. Пленку проявляют соответствующим проявителем, например Agfa Rodinal (при разведении 1 : 25, 20 °С, 3,5 мин). Свойства фотобумаги для получения отпечатков зависят от качества электрофореграммы и полученного негатива.

1.2.1.2. Анализ полученных результатов. При построении градуировочного графика на оси абсцисс откладывают длину пробега (в миллиметрах) или относительную подвижность R_f белковых зон, а на оси ординат — молекулярную массу белков-маркеров (рис. 1.1). Относительная подвижность R_f определяется к пробегу красителя или белка-маркера. Молекулярную массу исследуемого белка находят по градуировочному графику, используя экспериментальные значения R_f. Во избежание ошибок из-за вариабельности свойств геля рекомендуется проводить электрофорез исследуемого белка и стандартной смеси на одной

пластине. Ошибка определения молекулярной массы по градуировочному графику достигает 25% [98]. Большие отклонения наблюдаются в том случае, если олигомер в процессе электрофореза распадается на мономеры или если белок не обладает глобулярной структурой, как, например, фибриноген — фибриллярный белок, имеющий больший по сравнению с глобулярными белками равной молекулярной массы гидродинамический объем.

1.2.2. Гель-фильтрация

При гель-фильтрации разделение белков происходит главным образом по размерам белковой глобулы [6, 59]. В настоящей главе рассматривается хроматография на открытых колонках, хотя сегодня в связи с созданием новых колонок, приборов, методов набивки более важным методом является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ; см. гл. 6). Вместе с тем принципы разделения на открытых и закрытых колонках полностью идентичны.

Гель-фильтрацию проводят на колонках, заполненных частицами набухшего геля, имеющими поры определенного диаметра. Общий объем столбика геля обозначают V_t. Общий объем можно найти расчетным путем по форме колонки или же экспериментально по объему заполняющей ее воды. В процессе элюирования крупные молекулы, не проникающие в гранулы геля, перемещаются с высокой скоростью вместе с растворителем, находящимся между гранулами, и элюируются в виде узкой зоны. Объем элюента, соответствующий появлению этой зоны, обозначают v_0 (свободный объем). Менее крупные молекулы проходят через колонку не так быстро, так как они проникают в гранулы геля и их выход с колонки занимает продолжительное время. Поскольку степень диффузии в гранулы геля зависит от размеров молекул, вещества элюируются с колонки в порядке уменьшения их молекулярной массы. Молекулярная масса M исследуемого белка определяется путем сравнения объема элюирования V_e с аналогичным параметром для белков-маркеров. Этому вопросу посвящены исчерпывающие обзоры [1, 59] и проспекты фирмы Pharmacia [134].

1.2.2.1. Методики. Для получения удовлетворительных результатов необходимо использовать хроматографические колонки соответствующих размеров и подходящей конструкции. Такие колонки выпускаются фирмой Pharmacia (Швеция). Аналитические эксперименты проводят в колонках диаметром ~15 мм, препаративные — в колонках диаметром 25—50 мм. Длина колонок составляет 500—1000 мм; если позволяет жесткость гранул геля используются колонки и большей длины. Кроме того,

необходимы также фракционный коллектор, перистальтический насос и проточный денситометр.

Для хроматографических экспериментов подбирают гель с такими свойствами, чтобы зона исследуемого белка приходилась на середину профиля элюирования. Пористый носитель готовят на основе декстрана, акриламида и/или агарозы (с различной степенью сшивки), позволяющих разделять вещества с разными молекулярными массами. Агарозные гели (сефароза, биогель А) используют для фракционирования крупных белков с молекулярной массой вплоть до нескольких миллионов. Путем соответствующей обработки агарозы получают сефарозу CL (поперечно-сшитую), которая обладает достаточной жесткостью и допускает высокие скорости элюирования. Белки с молекулярной массой $<1\,000\,000$ фракционируют на сефадексе, биогеле Р или ультрагеле (фирма LKB). Снижение степени сшивки уменьшает жесткость геля и допустимую скорость элюирования, но увеличивает предел исключения по молекулярной массе. Более прочный гель (сефакрил), позволяющий проводить элюирование при более высоких скоростях (5—10-кратных), получают сшивкой аллилдекстрана N,N′-метиленбисакриламидом [89, 123].

Для получения наилучших результатов рекомендуется следовать стандартным методикам [134]. Высушенные гранулы геля выдерживают (или автоклавируют) в рабочем буфере в течение трех суток. Гели, поставляемые в виде суспензий, например сефакрил, промывают рабочим буфером и готовят суспензию в этом буфере. В колонку наливают немного буферного раствора, а затем осторожно по стенке переносят деаэрированную суспензию гранул геля. На пористую пластинку в нижней части колонки можно предварительно поместить небольшой слой жесткого геля сефадекса G-25, что позволит исключить забивание пластинки обломками гранул при работе на мягких гелях. Если объем суспензии превышает объем колонки V_t, то колонку наращивают. При набивке колонки скорость потока жидкости (буфера) может быть несколько выше, чем при последующем фракционировании, однако скорость потока и гидростатическое давление не должны превышать величин, рекомендованных фирмами-изготовителями. После формирования столбика геля через колонку пропускают не менее двух объемов рабочего буферного раствора. При использовании длинных колонок поток элюента рекомендуется подавать снизу вверх. С этой целью колонки снабжают специальными приспособлениями (фирмы Pharmacia, LKB, Wright).

Обычно используют буферные растворы с pH 6÷8 и ионной силой $\geqslant 0{,}1$ (например, 0,1 М трис-HCl — 0,1 М NaCl, pH 8,0); иногда в зависимости от свойств исследуемого белка приходится изменять параметры буфера, например увеличить ионную силу

с тем, чтобы воспрепятствовать агрегации олигомеров. Однако в случае сефарозы эффективность разделения зависит от концентрации солей и pH [104]. Хроматографию на сефакриле рекомендуется вести при ионной силе >0,5 или при pH 5,5, поскольку этот гель проявляет слабые ионообменные свойства [19].

Постоянную скорость элюирования задают с помощью перистальтического насоса. Элюат, собираемый на фракционном коллекторе, анализируют в потоке или выборочно по фракциям на содержание белка, для чего обычно регистрируют изменение оптической плотности при 280 нм. Другие методы детектирования используют при отсутствии в белке хромофоров (остатков триптофана и тирозина), при работе на микроуровне или при слишком высоком поглощении при 280 нм, например благодаря присутствию кофактора. В этих случаях можно определять оптическую плотность при 220 нм, интенсивность флуоресценции или радиоактивность (при работе с мечеными белками) [14, 161]; наконец, при анализе белковых фракций можно использовать химическую модификацию (разд. 1.4.5.1). Например, определенные объемы (аликвотные части) отдельных фракций можно подвергнуть щелочному гидролизу и последующему анализу по реакции с нингидрином. Для обнаружения белков можно использовать реакцию Лоури или реакцию связывания красителя. Последний метод вполне можно рекомендовать как наиболее простой и чувствительный, причем этому определению не мешает присутствие химических реагентов. Кроме того, состав фракций можно определять с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Свободный объем V_0 обычно определяют по объему элюирования голубого декстрана 2000 (фирма Pharmacia), суспензии вируса табачной мозаики, ферритина или других объектов с высокой молекулярной массой, не проникающих в гранулы геля. Теоретически V_0 составляет 35% полного объема столбика геля V_t. Получение хорошо образованной (неразмытой) зоны синего декстрана служит критерием качества набивки колонки. В качестве маркера готовят раствор голубого декстрана (1 мг/мл) или белка (5—20 мг/мл) в буферном растворе, содержащем 10% (масс./об) сахарозы (плотность образца должна быть выше плотности элюирующего буфера). Образец маркера аккуратно наносят на колонку с помощью шприца или крана с дозирующей петлей. С целью уменьшить сорбцию голубого декстрана на сефадексе и сефарозе рабочий буфер должен иметь pH$\geqslant$5, а при работе на сефакриле — pH$\geqslant$7. Объем образца не должен превышать 1—2% общего объема геля V_t. По завершении эксперимента определяют объем элюирования V_e исследуемого белка (по максимуму поглощения на

графике оптическая плотность — объем элюирования). В случае превышения рекомендованного оптимального объема образца на кривой элюирования формируется плато, что затрудняет определение истинного значения V_e. Объем элюирования V_e можно найти по скорости элюирования, которую либо измеряют непосредственно в потоке или находят косвенным методом, измеряя количество элюата, собранного в единицу времени. Поскольку V_e пропорционален времени элюирования, в основу расчетов может быть положено время выхода с колонки исследуемого белка.

1.2.2.2. Анализ полученных результатов. При определении молекулярных масс методом гель-фильтрации для конкретной хроматографической колонки предварительно строят градуировочный график. На оси абсцисс откладывают объем элюирования или связанные с ним параметры, а на оси ординат молекулярную массу (в логарифмической шкале) известных белков. Наборы белков-маркеров фирмы Pharmacia включают рибонуклеазу (M 13 700), химотрипсиноген А (M 25 000), овальбумин (M 43 000), альбумин (M 67 000) или альдолазу (M 158 000), каталазу (M 232 000), ферритин (M 440 000), тироглобулин (M 669 000). Часто в расчетах используют величину V_e, однако более удобен коэффициент распределения K_{av} между жидкой фазой и фазой геля, поскольку этот параметр не зависит от объема колонки:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

На рис. 1.2 приведен градуировочный график в координатах $\lg M$—K_{av} для сефадекса G-200. Удобно также использовать график $\lg(100 \cdot K_{av})$ от $N^{2/3}$ (где N — число аминокислотных остатков в белках-маркерах), который имеет линейную форму. При градуировке колонки рекомендуется использовать такие белки-маркеры, которые обеспечивают хорошее разрешение и определение K_{av} с высокой точностью.

Параметры большинства белков вписываются в градуировочный график. Отклонения возможны в тех случаях, когда олигомер склонен к агрегации или диссоциации на мономеры или же не относится к глобулярным белкам [12]. Белки не должны сорбироваться в гранулах геля и порождать тем самым ложные зоны (пики), принимаемые за низкомолекулярные примеси. Известно, что белки с высоким содержанием ароматических аминокислот или олигосахаридных цепей сорбируются на сефадексе. Потери белка на колонке по причине выпадения в осадок или сорбции можно оценить, сопоставляя суммарное содержание белка (по поглощению при 280 нм) в элюате и исходном образце, нанесенном на колонку.

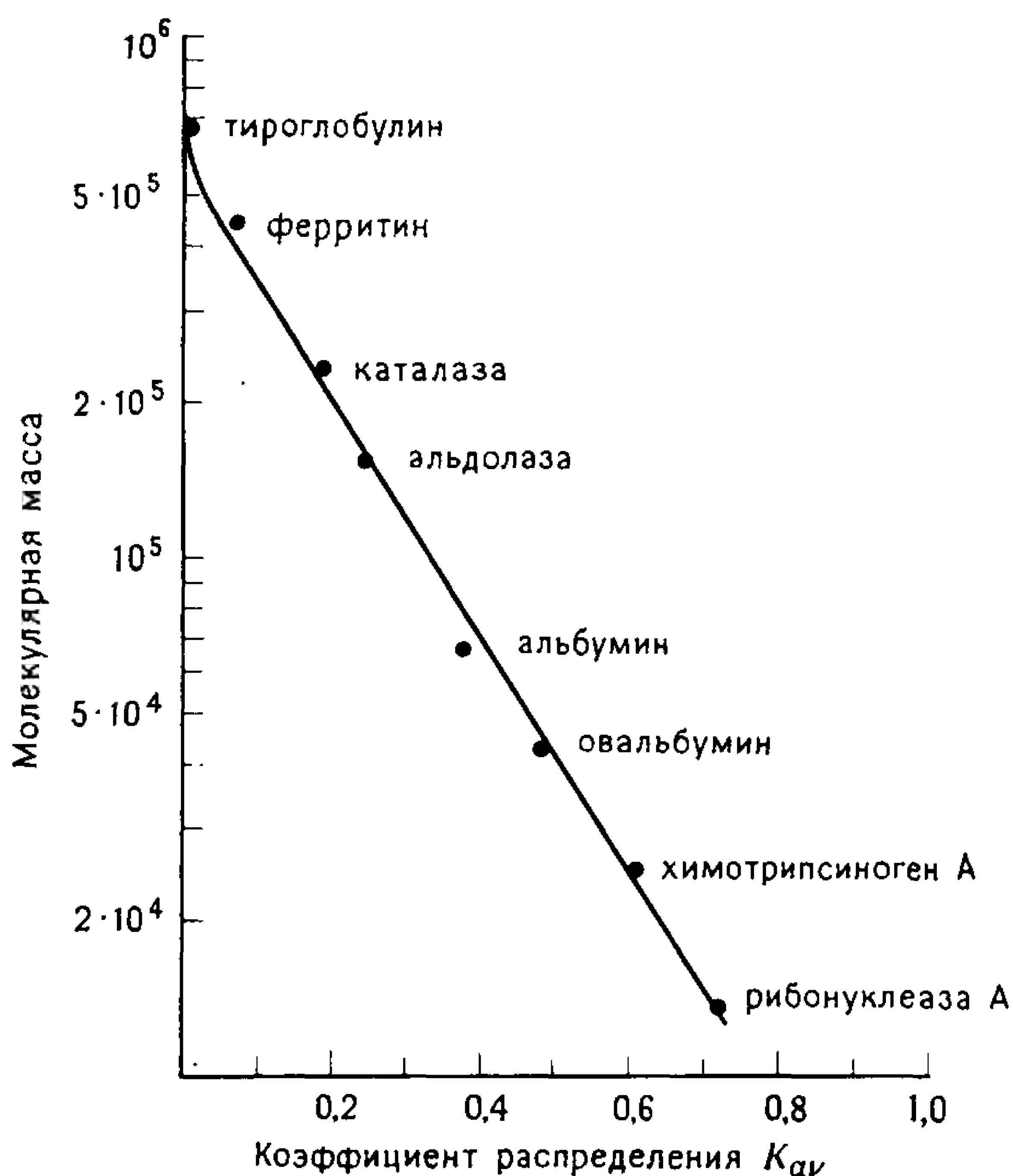


РИС. 1.2. Градуировочный график для сефадекса G-200, построенный с использованием белков-маркеров фирмы Pharmacia (из методического руководства фирмы).

1.3. Идентификация мономеров

В большинстве случаев первым шагом в идентификации мономеров является диссоциация исходного олигомера. Диссоциацию целесообразно проводить в мягких условиях, иногда для этого достаточно изменения pH, но чаще всего необходимо присутствие денатурирующих агентов — мочевины, гуанидингидрохлорида, додецилсульфата натрия (ДСН). Диссоциации олигомера за счет электростатического отталкивания мономеров способствует химическая модификация олигомера, например обработка ангидридами дикарбоновых кислот (разд. 1.4.3 и 1.4.4).

При идентификации мономера необходимо учитывать возможное присутствие в нем дисульфидных связей. При наличии в мономере тиольной группы в определенных условиях может наблюдаться как внутри-, так и межцепочечный дисульфидный обмен, что приводит к искажению хроматографических или электрофоретических характеристик. Подобные осложнения возникают и в том случае, если мономеры с восстановленными ди-

сульфидными связями находятся в растворе, не содержащем восстановителя (например, 0,05 М 2-меркаптоэтанола). После восстановления дисульфидных связей рекомендуется перевести остатки цистеина в стабильные производные путем алкилирования (разд. 1.5.1) иодоацетамидом без изменения суммарного заряда белка или иодоуксусной кислотой, несущей отрицательный заряд (разд. 2.2.1). Введение дополнительного отрицательного заряда повышает растворимость белка при нейтральных pH и вместе с тем вносит различный вклад в суммарный заряд мономеров. Алкилирование цистеина — реакция необратимая, и, следовательно, модифицированные остатки цистеина препятствуют сборке исходного олигомера (разд. 1.4.4). Поскольку при хранении в растворе белки склонны к агрегации, целесообразно работать только со свежеприготовленными растворами.

1.3.1. Методы определения молекулярной массы мономеров

Для определения молекулярной массы мономеров используют электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии ДСН и гель-фильтрацию в классическом и современном (ВЭЖХ) вариантах. Предпочитают использовать электрофорез в ПААГ или ВЭЖХ, однако в настоящее время ВЭЖХ уступает электрофорезу по качеству разрешения близких по молекулярной массе белков (гл. 6). Белки, содержащие более 10% углеводов, рекомендуется хроматографировать на агарозных гелях, так как электрофорез может не дать точных результатов из-за различия в связывании ДСН с полипептидной цепью и полисахаридными фрагментами. Следует также напомнить, что мономер может включать несколько полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями, поэтому определение молекулярной массы следует проводить как до, так и после восстановления S—S-мостиков.

Молекулярную массу можно найти по данным количественного анализа N-концевых аминокислот (разд. 1.3.1.4). По расходу материала (количество образца) этот метод эквивалентен гель-фильтрации; при инструментальном анализе расход материала существенно меньше (гл. 12, 15, 17).

Статистическая обработка данных для 500 белков показала, что наиболее вероятная область молекулярных масс мономеров приходится на 10 000—60 000 [63]. Действительно, молекулярные массы субъединиц более чем $^{2}/_{3}$ изученных к настоящему времени белков располагаются в указанном диапазоне. Примерно 50% этих белков составляют димеры, 30% — тетрамеры, 8% — гексамеры.

1.3.1.1. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН. Большинство белков в присутствии ДСН диссоциируют на субъединицы. Субъединицы, состоящие из двух и более полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями, могут подвергаться дальнейшей диссоциации в присутствии восстанавливающих агентов, например 2-меркаптоэтанола (разд. 1.5.1). Полипептидные цепи в общем связывают ДСН равномерно, примерно 1,4 г/г белка [143]; при этом комплекс приобретает сильный отрицательный заряд. Собственный суммарный заряд нативного белка маскируется, а отношение заряда к массе становится практически постоянным. Кроме того, ДСН вызывает конформационные изменения полипептидной цепи, хотя ее абсолютная конфигурация может быть и неизвестной (это может быть палочка, ожерелье, вытянутый эллипсоид, статистический клубок). Показано, что при электрофорезе в ПААГ комплексы мигрируют в соответствии с молекулярной массой [182]. Длину полипептидной цепи определяют путем сравнения электрофоретической подвижности комплекса с подвижностью белков-маркеров с известными молекулярными массами. На практике метод используется в трех вариантах:

1. Непрерывная буферная система (обычно фосфатный буфер [182]) в однородном геле.
2. Ступенчатая буферная система в однородном геле [95].
3. Непрерывная или ступенчатая буферная система в градиентном геле.

Каждому варианту свойственны собственные преимущества и недостатки. Общие принципы и методика эксперимента электрофореза в ПААГ подробно рассмотрены в ряде исчерпывающих публикаций [3, 35, 73, 183]. В ступенчатой системе образцы предварительно концентрируются в «формирующем» геле, после чего входят в рабочий гель в виде узких зон. В непрерывной системе предварительное концентрирование исключено и при нанесении образца в большом объеме по завершении электрофореза образуются широкие зоны. Если образец наносить в небольшом объеме, результаты в обеих системах должны быть идентичны. Наблюдающиеся иногда различия в результатах, возможно, обусловлены частичной диссоциацией комплекса при электрофорезе в ступенчатой системе.

По ряду причин многие белки связывают ДСН в аномально низком соотношении [164]. Причиной может быть необычный состав, присутствие углеводов; к этой группе относятся белки с высоким положительным или отрицательным зарядом. Электрофоретическая подвижность комплексов может меняться в зависимости от замен отдельных аминокислот, конформационных изменений в белках [40, 46, 126]. Подобное аномальное поведение можно обнаружить и свести к минимуму путем проведе-

ния электрофореза в гелях различной пористости и построения по результатам эксперимента графика Фергюсона (см. далее). Иными словами, для достоверной оценки кажущейся молекулярной массы в ступенчатой или непрерывной системе необходимо проводить измерение по крайней мере в четырех различных гелях.

При электрофорезе в градиентном геле полипептиды мигрируют до достижения зоны с определенной пористостью, препятствующей их дальнейшему продвижению. Если все комплексы полипептидов с ДСН имеют одинаковую форму, концентрацию ПААГ в этой зоне можно принять характеристической для данной молекулярной массы [97, 99, 101, 137]. Комплекс может частично разрушиться с потерей ДСН, в особенности в области, близкой к равновесному состоянию, однако это не влияет на конечный результат. Объем образца не влияет на ширину белковых зон, тем не менее наносить образец в большом объеме не рекомендуется. При электрофорезе в градиентном ПААГ формирование градиента с высокой воспроизводимостью может быть затруднительным. Однако для этих целей выпускаются преформированные гели высокого качества.

Аппаратура и реактивы. Полиакриламидные гели готовят в виде стержней в стеклянных трубках или в виде пластин; последний вариант более удобен при определении молекулярных масс. При электрофорезе в трубках различная электрофоретическая подвижность может быть обусловлена изменениями степени полимеризации геля, а также зависеть от длины слоя геля, условий проведения электрофореза. Техника извлечения геля из трубок разработана детально [35]; показано, в частности, что извлечение гелей с концентрацией мономеров более 10% бывает затруднительным. Рекомендации по использованию аппаратуры и меры безопасности при работе с реактивами обсуждаются в разд. 1.2.1.1.

30%-ный запасной раствор, содержащий 29,2% (масс./об.) акриламида и 0,8% (масс./об.) N,N′-метиленбисакриламида, фильтруют и хранят при 4 °C (в этих условиях раствор можно хранить в течение нескольких месяцев). Перед употреблением раствор нагревают до 20 °C и деаэрируют в вакууме водоструйного насоса.

N,N,N′,N′-тетраметилендиамин (ТЕМЕД) перегоняют в вакууме и хранят в темном сосуде при 4 °C. Реактивы высокого качества поставляются фирмой Biorad и другими фирмами. Рекомендуется использовать ДСН («ос. ч.») фирмы BDH, поскольку на разрешение зон и общий конечный результат могут оказывать влияние примеси в ДСН, например натрийтетрадецилсульфат [21, 50, 118]. Остальные реактивы должны иметь квалификацию «ч. д. а.». Для дополнительной очистки ДСН можно

перекристаллизовать из этанола (600 г растворяют в 3 л 80%-ного этанола и обрабатывают активированным углем).

Полиакриламидные гели. Свойства геля зависят от общей концентрации мономеров (акриламид+N,N′-бисакриламид) и доли сшивающего агента (N,N′-метиленбисакриламида) [34]. Гели готовят путем радикальной полимеризации мономеров в водном растворе в присутствии катализатора — персульфат аммония+ТЕМЕД.

После внесения персульфата раствор перемешивают до растворения кристаллов и быстро переносят в систему для проведения электрофореза. Следует принять меры против образования в геле пызырьков воздуха. Для этого на иглу шприца надевают отрезок тонкого шланга (силиконового, полиэтиленового), по которому осторожно по стенке наслаивают рабочий раствор мономеров. Гребенку для формирования лунок осторожно погружают в раствор, удаляют с зубцов пузырьки воздуха и выдерживают раствор до завершения полимеризации. Скорость полимеризации может варьировать в зависимости от концентрации персульфата аммония и ТЕМЕД. В среднем полимеризация должна завершиться спустя 10—25 мин после добавления персульфата. Ускоренная или замедленная полимеризация плохо воспроизводится и может привести к образованию геля с неравномерными порами.

Соотношение компонентов для приготовления 10 мл акриламидного геля различной концентрации

	5%	7,5%	10%	12,5%
30%-ный раствор акриламида	1,67 мл	2,50 мл	3,33 мл	4,17 мл
Запасной буфер (фосфат-ДСН)	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Вода	6,33 мл	5,50 мл	4,67 мл	3,83 мл
ТЕМЕД	5 мкл	5 мкл	5 мкл	5 мкл
Персульфат аммония	10	10	10	10

Приготовление образца. Лиофильно высушенный образец белка растворяют в стартовом буфере (см. далее), образец в растворе диализуют против стартового буфера в течение 3—12 ч. Равновесная концентрация ДСН в образце достигается во времени, поэтому перед диализом к раствору белка добавляют сухой ДСН [до концентрации 1% (масс./об.)]. С целью полноты денатурации и связывания с ДСН образцы инкубируют при 95—100 °С в течение 2 мин. Содержание белка в образце должно быть 0,5—1 мкг/мкл; в зависимости от толщины геля в лунки вносят 2—10 мкл такого раствора. Нагрузка существенно меньше, если обнаружение предполагают вести с помощью солей серебра. При проведении электрофореза в ступенчатой системе можно в случае необходимости вносить и большие объемы, при работе в непрерывной системе разбавленный образец

концентрируют. С этой целью белок осаждают сульфатом аммония или трихлороуксусной кислотой, осадок вновь растворяют в стартовом буфере до достижения оптимальной концентрации (0,5—1 мкг/мкл).

Если белок плохо растворим (имеются в виду липопротеины и мембранные белки), в образец добавляют 8 М мочевину или неионный детергент, например 1%-ный тритон Х-100, или увеличивают концентрацию ДСН до 10%. В последнем случае образец и буферные растворы не должны содержать ионов калия или солей гуанидина, так как эти анионы образуют с ДСН плохо растворимые соли. Полиакриламидные гели градуируют с помощью белков-маркеров, наборы которых выпускаются рядом фирм (Pharmacia, Biorad, BDH, Sigma, Calbiochem).

Непрерывная буферная система с постоянной концентрацией полиакриламида [182]. Основные компоненты этой системы: 0,05 М фосфатный буфер и 0,1%-ный ДСН.

Запасной буфер имеет следующий состав: 0,25 М фосфат (рН 7)+0,5% ДСН+0,02% азид натрия (13 г $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$+ +26 г Na_2HPO_4+0,2 г NaN_3+5,0 г ДСН). Для растворения фосфатов необходимо слабое нагревание; хранят раствор при температуре выше комнатной.

Электродный буфер готовят из запасного раствора путем разбавления дистиллированной водой в соотношении 1 : 4.

Образцы растворяют в буфере следующего состава: 20 мл запасного буфера+1 г ДСН+10 г глицерина+0,05 г бромофенолового синего+дистиллированная вода (до объема 100 мл). При электрофорезе с целью определения молекулярной массы полипептидных цепей с восстановленными дисульфидными связями буфер должен содержать 1% (об./об.) 2-меркаптоэтанола.

После кратковременного нагревания до кипения образцы вносят в лунки геля с помощью микрошприца или микропипетки. Электрофорез ведут при 200 В до подхода зоны красителя к нижнему краю геля. Продолжительность эксперимента зависит от длины слоя геля и геометрии пластины. По завершении электрофореза проводят операции окрашивания, обесцвечивания и фотографирования (разд. 1.2.1.1).

Ступенчатая система с постоянной концентрацией полиакриламида [95]. Основные компоненты этой системы 0,375 М трис и 0,1%-ный ДСН.

Концентрация акриламида в рабочем геле 5%—25%, в формирующем геле (длиной 20 мм) 4,5%.

Рабочий буфер имеет следующий состав: 1,5 М трис+0,4% (масс./об.) ДСН, рН 8,8 (подтитрован HCl до указанного рН).

Буфер формирующего геля имеет следующий состав: 0,5 М трис+0,4% (масс./об.) ДСН, рН 6,8 (подтитрован с помощью HCl).

Образец растворяют в буфере следующего состава: 0,0625 М трис+2,3% (масс./об.) ДСН+10% (масс./об.) глицерина+0,05% (масс./об.) бромофенолового синего.

При определении молекулярной массы полипептидных цепей с восстановленными дисульфидными связями буфер содержит 1% (об./об.) 2-меркаптоэтанола или 100 ммоль/л дитиотреита.

Электродный буфер имеет следующий состав: 0,025 М трис+ +0,192 М глицин+0,1% (масс./об.) ДСН.

Соотношение компонентов для приготовления 10 мл акриламидного рабочего геля различной концентрации

	5%	7,5%	10%	12,5%
30%-ный раствор акриламида	1,67 мл	2,50 мл	3,33 мл	4,17 мл
Буфер для рабочего геля	2,5 мл	2,5 мл	2,5 мл	2,5 мл
Вода	5,83 мл	5,00 мл	4,17 мл	3,33 мл
ТЕМЕД	5 мкл	5 мкл	5 мкл	5 мкл
Персульфат аммония	10 мг	10 мг	10 мг	10 мг

Раствор деаэрируют дважды — перед добавлением ДСН и (вторично) перед прибавлением персульфата и ТЕМЕД. После внесения в систему на поверхность раствора осторожно наслаивают воду или насыщенный водой изобутанол. По завершении полимеризации верхний слой отсасывают, промывают поверхность геля буфером формирующего геля и наслаивают раствор для приготовления формирующего геля. Для приготовления 10 мл этого раствора (концентрация 4,5%) смешивают 1,5 мл запасного буфера, 2,5 мл буфера формирующего геля, 6,0 мл воды, 10 мг персульфата аммония, 10 мкл ТЕМЕД.

После кратковременного нагревания до кипения образцы вносят в лунки с помощью микрошприца или микропипетки. Электрофорез проводят при 100 В до прохождения красителем формирующего геля, затем при 200 В до подхода зоны красителя к нижнему краю геля. Продолжительность электрофореза зависит от длины геля и геометрии камеры, обычно электрофорез длится 3 ч.

Непрерывная или ступенчатая система в градиентном полиакриламиде. В этой методике используются рассмотренные ранее основные буферные системы. Единственное отличие от предшествующих систем состоит в том, что в блоке формируется градиент концентрации акриламида. Градиент образуют с помощью смесителя из двух сообщающихся сосудов и перистальтического насоса [113] или смесителя иной конструкции.

Фирмы Gradipore и Pharmacia производят преформированные пластины высокого качества (разд. 1.2.1.1). Преформированные гели не содержат ДСН, детергент вводят в гель на стадии предварительного электрофореза при 50 мА в течение 3 ч. Для приготовления электродного буфера запасной раствор (со-

держащий фосфат и ДСН) разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:9. После внесения образцов проводят электрофорез при 50 мА в течение 3,5 ч. За это время белковые зоны достигают равновесного положения, ограниченного размерами пор.

1.3.1.2. Анализ полученных результатов. Как отмечалось в разд. 1.2.1, молекулярные массы полипептидных цепей определяют с помощью градуировочного графика. Однако при электрофорезе в геле с постоянной концентрацией (пористостью) не удается исключить ошибки, обусловленные различием свободной подвижности Y_0 исследуемого белка и белков-маркеров [148, 149]. Поэтому рекомендуется проводить электрофорез в нескольких гелях различной концентрации. При этом результаты определения молекулярной массы будут тем точнее, чем меньше систематическое отклонение при изменении общей концентрации акриламида. Полученные результаты можно проанализировать с помощью эмпирического уравнения Фергюсона [57]

$$\lg R_f = -K_R T + \lg Y_0$$

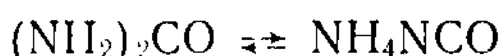
Коэффициент удерживания K_R для исследуемого белка и белков-маркеров определяется по наклону графика в координатах $\lg R_f$ — общая концентрация акриламида T, а молекулярную массу исследуемого белка находят по графику K_R — молекулярная масса белков-маркеров. Для надежного определения K_R электрофорез следует проводить по крайней мере в четырех гелях различной концентрации (7, 8; 9 и 10%), но предпочтительнее в семи гелях. Результаты экспериментов обрабатывают методами статистического анализа [148].

1.3.1.3. Гель-фильтрация. Общие принципы гель-фильтрации нативных белков рассмотрены в разд. 1.2.2; хроматография в денатурирующих условиях не имеет существенных особенностей. В присутствии денатурирующих агентов (гуанидингидрохлорид, мочевина, ДСН) меняется конформация белковых молекул, что часто приводит к увеличению гидродинамического объема. Поскольку разделение идет по размерам молекул, меняются диапазон молекулярных масс, а также градуировочный график для конкретного геля. Например, в неденатурирующих условиях на сефарозе CL-6B можно разделить белки с M 10^4—$4\cdot10^6$; в денатурирующих условиях в присутствии гуанидингидрохлорида диапазон молекулярных масс составляет 3000—80 000 [8].

Показано, что при высокой концентрации гуанидин-HCl восстановленные белки приобретают конформацию статистического клубка. В качестве эмпирического метода определения молекулярных масс денатурированных белков рекомендуется использовать хроматографию в 6 М гуанидин-HCl на гелях агарозы,

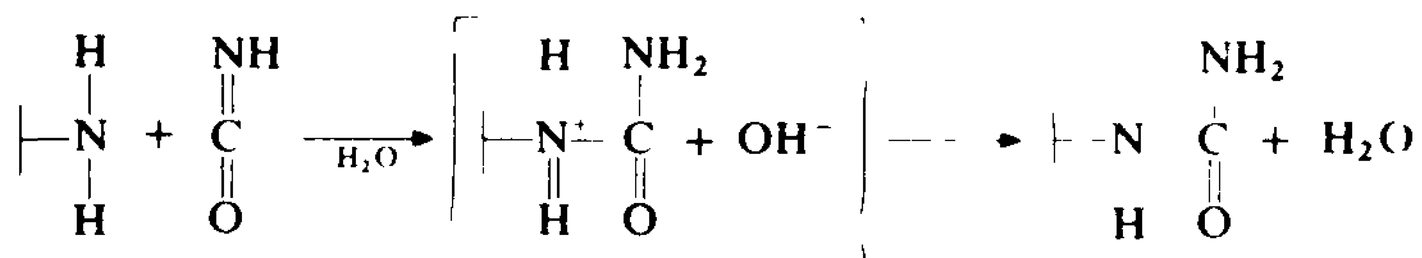
не сшитых поперечными связями (сефарозе, ультрогеле, биогеле А) [60, 111]. Главными недостатками этого метода являются продолжительность процесса (3—5 дней) и плохая устойчивость несшитой агарозы в присутствии 6 М гуанидин-HCl [110]. Сшитые агарозные гели (например, сефароза CL-6B) более устойчивы; в присутствии гуанидин-HCl свойства таких гелей остаются неизменными по крайней мере в течение года, а скорость элюирования может быть увеличена в 3—4 раза [8, 25, 110]. Гель-фильтрация в присутствии гуанидин-HCl особенно важна при анализе гликопротеинов, поскольку в случае высокого содержания в белке углеводов электрофорез в ПААГ-ДСН дает ненадежные результаты. Хроматография на сефакриле S-200 — эффективный метод определения молекулярных масс небольших полипептидов с $M<30\,000$ [18]. К качеству гуанидин-HCl предъявляются высокие требования; рекомендуется использовать препарат квалификации «ос. ч.» фирмы Schwarz-Mann. В случае необходимости гуанидин-HCl очищают перекристаллизацией или готовят из гуанидинкарбоната [127].

При работе на большинстве гелей в качестве компонентов элюирующего буфера используется также 8 М мочевина или 0,1% ДСН. Показано, однако, что несшитые агарозные гели медленно разрушаются при высоких концентрациях мочевины. Элюирующий буфер (0,05 М фосфатный или 0,1 М аммонийбикарбонатный) обычно имеет pH 7—8. При использовании мочевины в буфер добавляют 0,1 М хлорида натрия с целью уменьшить электростатическое взаимодействие между матрицей геля и заряженными группами полипептидной цепи. Обнаружено [47], что в водных растворах мочевины самопроизвольно образуется цианат:



$$(NH_2)_2CO \rightleftharpoons NH_4NCO$$

Накопление цианата идет с максимальной скоростью при pH≥6, однако заметные количества цианата образуются и в кислой среде, даже при 0 °C [71]. Кинетические исследования реакции цианата с аминогруппой белка показывают, что цианат и аминогруппа вступают в реакцию в непротонированной форме согласно уравнению



Это согласуется с различиями в скорости реакции α-аминогруппы ($pK_A \approx 8$) и ε-аминогруппы ($pK_A \approx 10{,}7$): при pH 7 скорость реакции α-аминогруппы в 100 раз выше [166]. В области pH<4 и pH>10 карбамилирование аминогрупп не

идет [174]. Помимо аминогрупп цианат вступает в реакцию с тиольными, карбонильными, имидазольными, фосфатными и реакционноспособными гидроксильными группами белков [166].

Здесь уместно напомнить, что интактные дисульфидные связи могут продолжать удерживать полипептидную цепь в свернутом состоянии даже при денатурации в 6 М гуанидин-HCl. В результате гидродинамический объем полипептидной цепи оказывается уменьшенным по сравнению с состоянием полной денатурации (с разрывом S—S-связей). Этот эффект становится более заметным по мере удлинения полипептидной цепи, увеличения числа дисульфидных групп и размеров петель. В таких случаях следует проявлять известную осторожность в оценке результатов определения молекулярных масс. С целью контроля проводят хроматографический анализ после восстановления и алкилирования дисульфидных мостиков. Сумма молекулярных масс отдельных полипептидных цепей должна соответствовать общей молекулярной массе исследуемого белка. Если после восстановления S—S-связей стадию алкилирования опускают, хроматография должна проводиться при pH 3 (в условиях, когда SH-содержащие цепи достаточно устойчивы при комнатной температуре) или в присутствии восстановителя, например 2-меркаптоэтанола (0,1 моль/л). Присутствие восстанавливающего агента часто мешает определению белков в элюате при 280 нм, поскольку в этой области поглощает окисленная форма 2-меркаптоэтанола. В таком случае применяют другие методы анализа, например перед хроматографией в белок вводят радиоактивную метку (разд. 1.4.5.1).

Получение гуанидингидрохлорида [127]. 1 кг гуанидинкарбоната растворяют при 40 °С в 2 л воды, прибавляют 3 л этанола и выдерживают на холоду в течение нескольких часов. Кристаллическую массу отделяют фильтрованием, дважды промывают водным этанолом (этанол : вода=2 : 1), затем этанолом. Перекристаллизованный гуанидинкарбонат (выход 880 г) растворяют в 500 мл воды, раствор охлаждают на ледяной бане и при перемешивании медленно прибавляют к суспензии 6 М HCl до достижения в растворе pH 4 (эта величина pH должна сохраняться в течение 12 ч). Полученный гуанидингидрохлорид очищают путем дробной кристаллизации. Часть раствора упаривают при 40 °С до начала кристаллизации, выдерживают на холоду, кристаллы отделяют фильтрованием, маточный раствор объединяют с очередной порцией основного раствора и повторяют указанную последовательность операций. Конечный продукт — 780 г гуанидингидрохлорида — может быть вторично перекристаллизован из воды по описанной методике или из метанола. В случае необходимости для удаления окрашенных примесей используют активированный уголь. Оптическая плотность 6 М раствора гуанидингидрохлорида при 225 нм должна составлять 0,1.

Приготовление растворов мочевины. Как уже отмечалось, при хранении растворов мочевины образуется цианат, причем скорость образования цианата зависит от pH раствора [71]. Поэтому непосредственно перед использованием растворы мочевины обязательно надо пропускать через колонку со смешанным ионообменником (например, через колонку с элгалитом). Контроль раствора мочевины осуществляют путем измерений электропроводности,

которая должна иметь величину ≤ 2 мкСм. Для связывания цианата в растворы мочевины иногда добавляют амины, например трис [75] или этаноламин [41].

1.3.1.4. Количественный анализ N-концевых аминокислот. Определение N-концевых аминокислот используется для доказательства высокой степени очистки олигомера (мономера) или отдельных полипептидных цепей. По данным количественного анализа N-концевых аминокислот можно получить представление о молекулярной массе исходного белка или рассчитать число полипептидных цепей. Например, если содержание N-концевой аминокислоты окажется в 2 раза выше теоретического или будут обнаружены две различные аминокислоты в эквимолярном соотношении, можно сделать вывод, что олигомер состоит из двух различных пептидов. При этом предполагают, что N-концевые аминокислоты не заблокированы, например из-за карбамилирования в растворах мочевины. Некоторые аминокислоты, например аспарагин, глутамин, серин, неустойчивы в условиях деградации по Эдману; в этом случае при интерпретации результатов вводят поправки.

Обычно используют прямой вариант метода Эдмана, ФТГ-аминокислоты определяют количественно по поглощению при 269 нм в этаноле [55]. При количественном определении ФТГ-аминокислот рекомендуется провести предварительную очистку модифицированного белка, а затем гидролиз и экстракцию.

Разработана методика, где метод изотопного разбавления используется в сочетании с деградацией по Эдману [15]. Согласно одному из вариантов этого метода, проводят одну стадию деградации по Эдману, в ходе которой блокируются ε-аминогруппы остатков лизина, а затем конденсируют второй N-концевой остаток с реагентом, содержащим радиоактивную метку [94]. В этом случае нет необходимости экстрагировать производное N-концевой аминокислоты. Для количественного определения белка в образце используют аминокислотный анализ, а в аликвотных пробах гидролизата определяют радиоактивность. Для определения удельной радиоактивности [^{14}C]ФИТЦ образец очищенного пептида модифицируют аналогичным образом.

С целью повышения растворимости белка на первой стадии можно использовать сульфофенилизотиоцианат [23] или на второй стадии ввести в буфер ДСН (1%). В случае пенообразования из-за присутствия ДСН на стадии экстракции бензолом добавляют каплю *н*-октанола.

Количественное определение N-концевых аминокислот [15]. Количество белка в образце определяют с помощью аминокислотного анализа. Точную навеску (*W* в миллиграммах) лио-

фильно высушенного обессоленного белка конденсируют с ФИТЦ с известной удельной радиоактивностью, удаляют избыток реагента, проводят стадии отщепления и циклизации. Полученную таким путем меченую ФТГ-аминокислоту смешивают с известным количеством (N, в молях) немеченой ФТГ-аминокислотой и определяют удельную радиоактивность. Молекулярную массу M_r субъединицы рассчитывают по формуле

$$M_r = W\,\frac{S_1 - S_2}{NS_2}\cdot 10^3$$

S_1 и S_2 (Ки·моль$^{-1}$) — удельная радиоактивность ФИТЦ и ФТГ-аминокислоты соответственно.

Деградация по Эдману. К аликвотной части (400 мкл) раствора белка (~10 мг/мл) известной концентрации прибавляют 600 мкл пиридина, 47 мкл N-диметилаллиламина и ~3 мкл безводной трифтороуксусной кислоты, pH реакционной смеси 9,5. Затем добавляют 10 мкл фенил-^{14}С-изотиоцианата известной удельной радиоактивности и смесь инкубируют в атмосфере азота при 40 °С в течение 1,5 ч. Избыток реагента экстрагируют бензолом (2 мл×3), водную фазу высушивают лиофильно. К сухому остатку прибавляют 1 мл воды и ледяную уксусную кислоту, насыщенную сухим HCl, инкубируют при 40 °С в течение 2 ч. (Методику проведения деградации по Эдману см. также в гл. 12.)

Выделение и идентификация ФТГ-аминокислоты. К полученной реакционной смеси прибавляют известное количество немеченого производного N-концевой аминокислоты, экстрагируют этилацетатом (2 мл×2), экстракты объединяют и высушивают досуха. ФТГ-аминокислоту выделяют с помощью хроматографии на бумаге ватман SG81 в двух системах растворителей. Вначале используют систему хлороформ — метанол (9 : 1); зону, соответствующую положению ФТГ-аминокислоты, элюируют этилацетатом. Вторично хроматографируют в хлороформе, зону экстрагируют этанолом. Выделять ФТГ-аминокислоты можно также с помощью ВЭЖХ (гл. 13). Концентрацию ФТГ-аминокислоты в этаноле определяют, измеряя оптическую плотность A при 269 нм (ε=16 000 М$^{-1}$·см$^{-1}$) против этанола. Степень чистоты определяют по отношению A_{245}/A_{269} (для эталона это отношение равно 0,39). Для определения радиоактивности отбирают аликвотные части (~3 мкл).

Определение удельной радиоактивности фенилизотиоцианата. Меченый ФИТЦ (0,5 мКи) разбавляют немеченым реагентом до удельной радиоактивности 0,4 Ки/моль. Аликвотную часть (2 мкл) реагента прибавляют к образцу N-концевой аминокислоты (2 мг) в 1 мл водного пиридина (1 : 1) и инкубируют в атмосфере азота при 50 °С в течение 35 мин. Избыток ФИТЦ экстрагируют бензолом (2 мл×4), водную фазу высушивают лиофильно. Циклизацию и перегруппировку в фенилтиогидантоин проводят путем инкубации в 1 М HCl (500 мкл) при 80 °С в течение 10 мин. ФТГ-аминокислоту экстрагируют этилацетатом (2 мл×2), а затем очищают хроматографией на бумаге ватман SG81 или с помощью ВЭЖХ. Содержание ФТГ-аминокислоты определяют по оптической плотности при 269 нм, затем измеряют число импульсов в аликвотной части и рассчитывают удельную радиоактивность. Среднюю удельную радиоактивность рассчитывают на основании анализа четырех образцов ФТГ-аминокислоты.

Сцинтилляционные жидкости. Для приготовления жидкого сцинтиллятора 5 г 2-(4-*трет*-бутилфенил)-5-(4-бифенил)окса-3,4-диазола (бутил-ФБД) растворяют в 5 л толуола (высушенного над натриевой проволокой). Образцы ФТГ-аминокислоты в 3 мл этанола смешивают с 15 мл жидкого сцинтилля-

тора и регистрируют на счетчике радиоактивности до накопления 40 000 имп. Радиоактивность образца рассчитывают по формуле $D_n=N_н/E$, где $N_н$ — наблюдаемое число импульсов, а E — эффективность счета (для данного сцинтиллятора и счетчика радиоактивности). E находят по градуировочному графику, $E=N_c/D_c$, где N_c имп./мин (регистрируется прибором), а D_c — расп./мин эталона. Эффективность счета β-излучения радиоактивного атома углерода составляет 92—95%.

1.3.2. Методы выделения мономеров

Выделение и очистку мономеров с целью определения аминокислотного состава, получения пептидных карт или секвенирования осуществляют с помощью препаративных методов химии белка.

При работе с микроколичествами материала в белок вводят радиоактивную метку и пользуются аналитическими методами. Метка может быть внутренней (т. е. введенной in vivo) [14, 161] или присоединена химическими методами по функциональным группам аминокислот (как указано в разд. 1.4.5.1).

1.3.2.1. Разделение субъединиц по размерам. Если субъединицы заметно различаются по молекулярной массе, их выделяют с помощью гель-фильтрации в присутствии денатурирующих агентов. Основы и методика гель-фильтрации на аналитическом уровне рассмотрены в разд. 1.3.1.3; при фракционировании на препаративном уровне они существенно не меняются. Хроматографию, как правило, проводят на препаративных колонках диаметром 2,5÷5 см и длиной 100 см, рассчитанных на нагрузку от 500 мг до нескольких граммов белка.

Для разделения используют легколетучие буферные системы, в частности разбавленные растворы аммиака, уксусную и муравьиную кислоты, что позволяет выделять белки из элюатов с помощью лиофильного высушивания. Препараты для аминокислотного анализа рекомендуется получать гель-фильтрацией в 50—75%-ной муравьиной кислоте. Муравьиная кислота, сильный денатурирующий и солюбилизирующий агент, вызывает разрушение носителей на основе полисахаридной матрицы; в частности, не рекомендуется оставлять сефадексы в контакте с 75%-ной муравьиной кислотой на срок более трех недель.

Колонки изготовляют из стекла, соединительные шланги — из тефлона (рис. 1.3). Белки выделяют из элюата с помощью лиофильного высушивания в вакуумной системе с ловушками, предварительно фракции разбавляют до концентрации муравьиной кислоты ~10%. Принято считать, что муравьиная кислота не гидролизует пептидные связи, за исключением лабильной связи Asp-Pro.

При работе с количествами 2—3 мг и, возможно, до 100 мг определенным преимуществом перед традиционной гель-филь-

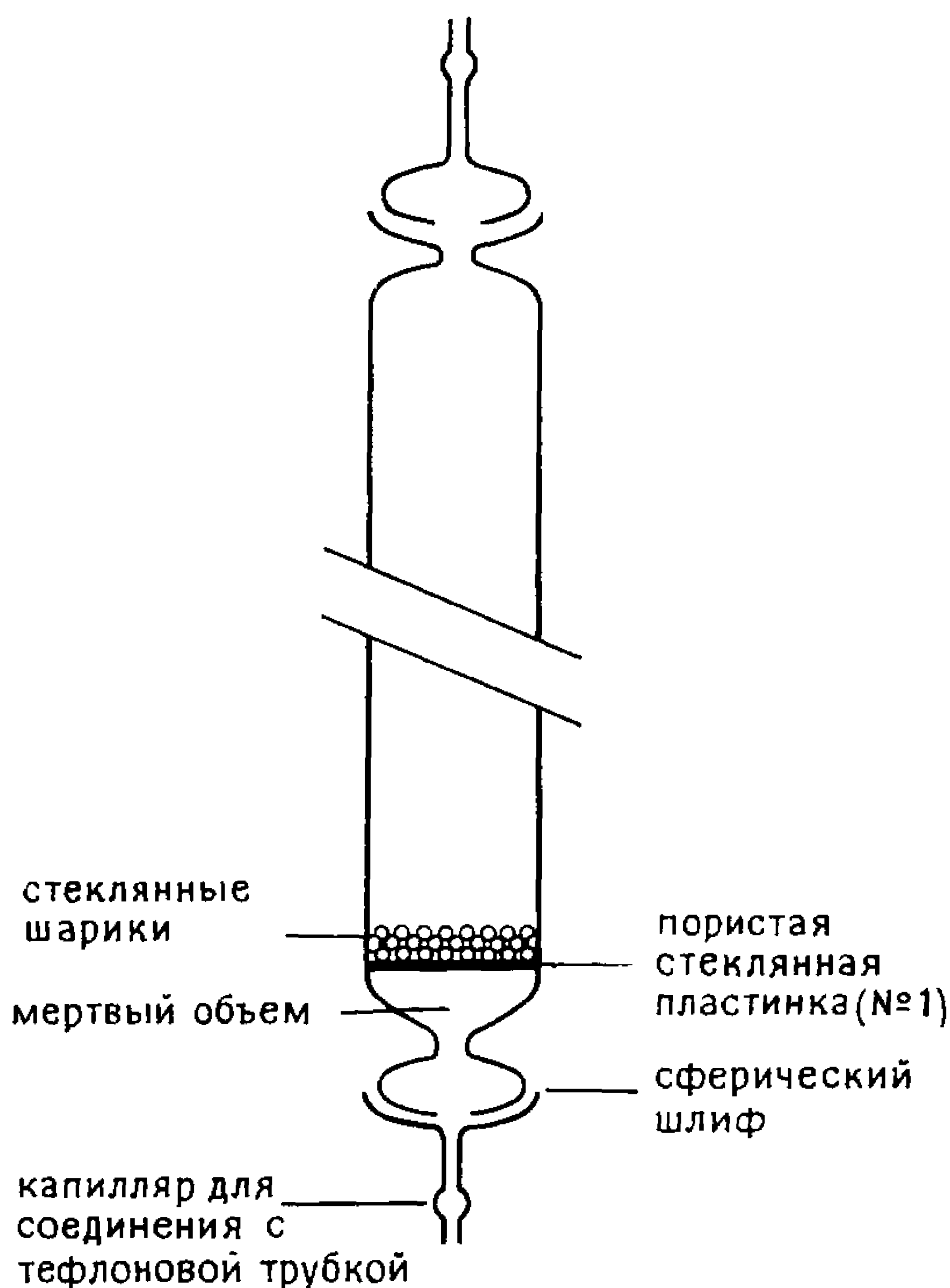


РИС. 1.3. Стеклянная хроматографическая колонка, предназначенная для проведения хроматографии с использованием в качестве элюента муравьиной кислоты.

трацией обладает ВЭЖХ. В этом случае укороченное время анализа вполне компенсирует небольшую емкость колонок. Несомненно, что благодаря технологическому прогрессу в недалеком будущем окажутся доступными колонки большой емкости, однако уже сегодня можно предполагать, что они будут иметь высокую стоимость. Мономеры можно разделять также с помощью препаративного электрофореза в ПААГ—ДСН. По производительности метод уступает гель-фильтрации: предельная нагрузка 50 мг белка, однако с помощью электрофореза можно разделять субъединицы с примерно равными молекулярными массами [168]. На практике в основном используются два различных варианта электрофореза. Первый вариант представляет собой модификацию аналитического метода. Можно, например, увеличить толщину пластины геля или, исключив гребенку, наносить образец в виде сплошной полосы. После проведения электрофореза для проявления белковых зон используют обработку по одной из следующих методик:

1. Гель выдерживают в красителе более короткое время или же используют более разбавленный раствор красителя (0,05%-ный раствор кумасси), чем это принято в типовой методике (разд. 1.2.1.1).

2. Окрашивают контрольные полоски геля (при сравнении с исходным гелем следует учитывать усадку пластины при обесцвечивании в смеси метанол — уксусная кислота).

3. Пропитывают гель 1 М KCl, после чего зоны белка обнаруживают по опалесценции за счет образования нерастворимого додецилсульфата калия [180].

4. Пропитывают гель 4 М ацетатом натрия, при этом зоны белка выявляются в виде прозрачных полосок (предел обнаружения 0,1 нг/мм^3) [76].

Зоны, представляющие интерес, вырезают и белок выделяют экстракцией [49, 64] или элюированием в условиях электрофореза [2, 175]. При определении аминокислотного состава приготовленных таким способом образцов обязательно вводят необходимые поправки, учитывающие присутствие акриламидного геля [26]. Согласно другому варианту, белки разделяют электрофорезом в блоке акриламидного геля, при этом под действием электрического поля белковые фракции попадают в проточную камеру, откуда и вымываются раздельно потоком элюэнта. Ход элюирования регистрируют с помощью проточного денситометра, элюат собирают на фракционном коллекторе. Недавно разработана методика элюирования белков из системы ПААГ — ДСН в промежуточный гель с использованием восходящего электрофореза [121]. Выход достигается высокий, однако образец может содержать примеси компонентов акриламидного геля и буферной системы. Гели для препаративного электрофореза могут иметь форму столбиков (LKB) или пластин (блоков) (Biorad). Для разделений по описанной методике используют различную аппаратуру, выпускаемую фирмами.

1.3.2.2. Ионообменная хроматография. Для разделения белков на субъединицы по суммарному заряду используют методы ионообменной хроматографии, электрофореза (разд. 1.3.2.3), изоэлектрического фокусирования и хроматофокусирования (разд. 1.3.2.4).

При ионообменной хроматографии образец наносят на колонку с ионитом (сорбентом), несущим положительно (анионит) или отрицательно (катионит) заряженные ионогенные группировки. На сорбенте, заряженном положительно, компоненты разделяемой смеси, также несущие положительный заряд (при условии, что pH буфера не превышает p*K*), проходят свободно с потоком элюента, а компоненты, заряженные отрицательно, удерживаются. Слабосорбированные вещества элюируют исход-

ным буфером, сильносорбированные «снимают» с колонки, пропуская раствор с более высокой ионной силой или с другим рН. В результате компоненты смеси элюируются в порядке возрастания суммарного заряда.

Ионогенные группы фиксируют на различных инертных носителях; наиболее распространенные из них гранулированная целлюлоза (фирмы Whatman, Serva, Bio-Rad, Eastman) и сферическая целлюлоза (фирма Pharmacia). В качестве носителя используются также агароза и декстран (имеющие поперечную сшивку). Ионообменники на основе декстрана характеризуются высокой емкостью и с успехом применяются для разделения не очень крупных биомолекул. Главным недостатком ионитов этого типа является сильная зависимость объема гранул от ионной силы и рН буферного раствора. При разделении изоформ соевой липоксигеназы-1 методом ВЭЖХ с успехом использовался катионит TSK-Gel LS-212 [9]. Недавно фирма Pharmacia выпустила крупнопористый ионообменник для ВЭЖХ, позволяющий проводить разделение с высокой скоростью и хорошим разрешением (гл. 6).

Большинство анионитов в качестве ионогенных функциональных групп включают диэтиламиноэтильную (ДЭАЭ) или диэтил(2-гидроксипропил)аминоэтильную (ДГПАЭ) группы. В катионитах ионогенными группами являются карбоксиметильная (КМ), фосфатная (Ф) и сульфопропильная (СП) группы. На сильных ионообменниках (содержащие группы ДГПАЭ, Ф и СП) рекомендуется фракционировать вещества, проявляющие слабокислотные или слабоосновные свойства, или вести разделения в области экстремальных рН. Эффективность разделения белков на ионитах зависит не только от суммарного заряда. Так, белки с высоким содержанием ароматических аминокислот фракционировали на ДГПАЭ-целлюлозе при рН 0,5 по их гидрофобным свойствам [65].

Выбор ионообменника зависит от свойств исследуемых белков. Обычно хроматографию проводят в том буфере, при котором целевые компоненты смеси предельно различаются по величине суммарного заряда. При выборе рабочего диапазона рН можно руководствоваться результатами электрофореза или изоэлектрофокусирования (т. е. изоточками компонентов смеси) (разд. 1.3.2.4). При отрицательном суммарном заряде хроматографию проводят на анионите, при положительном суммарном заряде — на катионите. Выбору оптимальных условий ионообменного разделения должна предшествовать предварительная оценка свойств разделяемой смеси с помощью простых тестов.

Выбор ионообменника. Аликвотные части раствора белка смешивают с катионитом и анионитом, уравновешенными буфером с определенным рН. По оптической плотности жидкости

над ионитом определяют степень связывания белка сорбентом и тем самым находят тип ионита и величину pH, при которых сорбция исследуемого белка достигает максимума. На практике в пробирки помещают по 0,05 г каждого ионита, например ДЭАЭ- и КМ-целлюлозу, и по 30 мл соответствующего буферного раствора (для анионита — 0,05 М трис-HCl, pH 8,5; для катионита — 0,05 М ацетат натрия, pH 5,0), содержащего 8 М мочевину (необходимую для диссоциации олигомера). Иониты приводят в равновесие с буферным раствором, заменяя супернатант свежим буфером дважды или более раз, большую часть жидкости над ионитом удаляют (так, чтобы общий объем ионита с буфером над ним составил 10 мл). В каждую пробирку прибавляют равное количество белка, перемешивают встряхиванием и после оседания ионита жидкость отделяют. Оптическую плотность супернатанта измеряют спектрофотометрически. Некоторые белки сорбируются как на катионите, так и на анионите, в этом случае оба этих ионита пригодны в качестве хроматографического сорбента. В то же время, если белок не сорбируется на ДЭАЭ и КМ-целлюлозе, необходимо уменьшить концентрацию буфера или использовать более сильные иониты.

Методика проведения ионообменной хроматографии. Исчерпывающую информацию относительно свойств и физических характеристик различных ионитов, а также практические рекомендации по работе с ними можно найти в материалах, выпускаемых фирмами-изготовителями. Хороший обзор по целлюлозным ионообменникам опубликован Петерсоном [133].

Сухой ионит предварительно подвергают кислотной и щелочной обработке и лишь затем уравновешивают рабочим буфером. Аниониты, например ДЭАЭ-целлюлозу, суспендируют в 0,5 М HCl (15 мл/г) и перемешивают в течение 30 мин. Жидкость отделяют фильтрованием, ионит промывают водой и суспендируют при перемешивании в равном объеме 0,5 М NaOH в течение 30 мин. Жидкость вновь отделяют, ионит промывают водой. Затем ионит суспендируют в рабочем буфере (20 мл/г), перемешивают в течение 10 мин, отделяют путем декантации и фильтрованием. Операцию повторяют трижды до тех пор, пока pH и электропроводность жидкости над ионитом не сравняется с параметрами рабочего буфера. Катиониты обрабатывают аналогичным образом, однако в иной последовательности. Например, КМ-целлюлозу промывают вначале 0,5 М NaOH, а затем 0,5 М HCl. Иониты, поставляемые во влажном виде, не нуждаются в предварительной «тренировке», их уравновешивают рабочим буфером по обычной методике.

Далее удаляют мелкую фракцию ионита. Суспензию взмучивают в мерном цилиндре, оставляют в покое для отстаивания в течение 1 ч, жидкость отбрасывают.

Готовят суспензию, свободно пропускающую пузырьки воздуха, деаэрируют в вакууме водоструйного насоса и набивают колонку. Для препаративных целей используют колонки диаметром 1,5÷2,5 см, длиной 50÷100 см; перед набивкой колонку снабжают насадкой, позволяющей в один прием внести всю массу ионита. После набивки пропускают через слой ионита 1—2 объема рабочего буфера. Скорость промывания должна быть идентична предполагаемой скорости элюирования, а объем сорбента должен оставаться постоянным.

Образец растворяют в исходном буфере, в случае необходимости диализуют в течение 12 ч. Если целевые компоненты смеси сорбируются достаточно прочно, объем раствора образца значения не имеет. В случае слабой сорбции объем вводимого в колонку образца не должен превышать 1—2% ее объема. Нагрузка должна быть $\leqslant$10% емкости сорбента.

Ход элюирования регистрируют по изменению оптической плотности при 280 нм (или с помощью методов, описанных в разд. 1.2.2.1), элюат собирают по фракциям. Компоненты смеси, удерживаемые ионитом, элюируют, изменяя ступенчато или плавно ионную силу или pH рабочего буфера. Элюирование в ступенчатом градиенте приводит к появлению артефактов и вследствие этого применяется все реже.

Способы формирования градиентов. Градиент концентрации или градиент pH формируют с помощью двух сообщающихся сосудов или перистальтического насоса. Выпускаются также специальные формирователи градиента.

Система из двух сообщающихся сосудов с вертикальными стенками изображена на рис. 1.4, *а*. Обозначим площадь поперечного сечения смесителя *1* и резервуара *2* как A_1 и A_2, а концентрации исходного и конечного буфера C_1 и C_2. Если оба буферных раствора имеют одинаковую плотность, то изменение концентрации элюента можно описать следующим образом:

$$C = C_2 - (C_2 - C_1)(1 - v/V)^{A_2/A_1}$$

где v — объем элюэнта, поданного системой на колонку, V — суммарный объем смесителя и резервуара. При $A_1 = A_2$ формируется линейный градиент, если $A_1 < A_2$, градиент выпуклый, если $A_1 > A_2$, градиент вогнутый [22].

Для построения градиентов можно использовать многоканальный перистальтический насос (рис. 1.4, *б*). Форма градиента определяется скоростью потока R_1 (из сосуда *2* в сосуд *1*) и R_2 (из сосуда *1* в колонку), концентрациями C_1 и C_2 и объемом V_1 сосуда *1*. Через время t концентрацию буфера, поданного на колонку, можно вычислить по формуле [96]:

$$C = (C_2 - C_1)\left[1 - \frac{V_1 - t(R_2 - R_1)}{V_1}\right]^{R_1/(R_2 - R_1)}$$

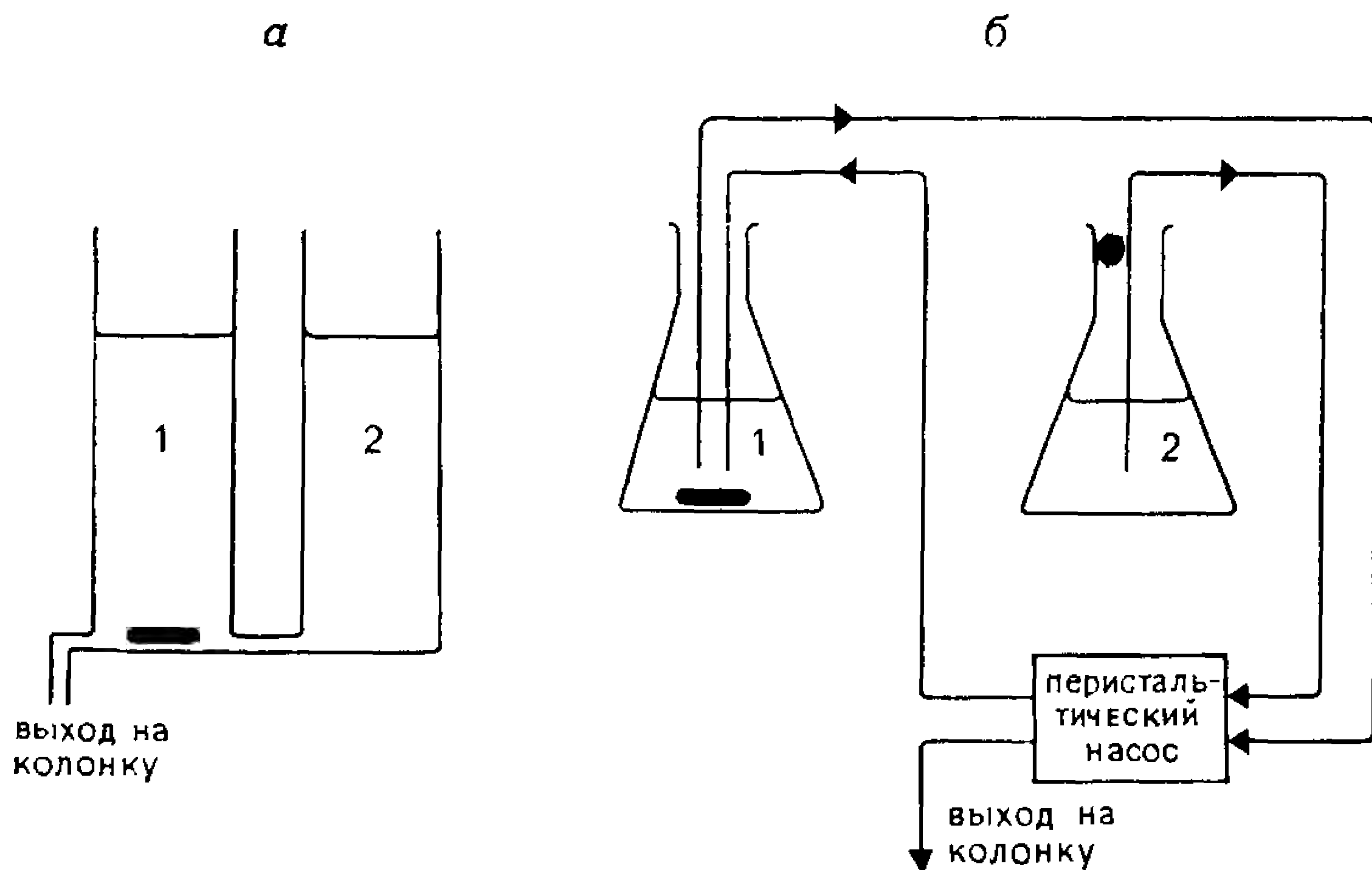


РИС. 1.4. Способы формирования градиента с помощью сообщающихся сосудов (*а*) и перистальтического насоса (*б*). *1* — смеситель; *2* — резервуар. Форма градиента определяется площадью поперечного сечения сосудов (*а*) или диаметром эластичных трубок перистальтического насоса (*б*).

Если $R_2=2R_1$, формируется линейный градиент, угол наклона которого определяется по формуле:

$$\frac{(C_2 - C_1)\, R_1}{V_1}$$

При $R_2>2R_1$ формируется выпуклый, а при $R_2<2R_1$ вогнутый градиенты. Если $R_1<R_2$, то соотношение объема смесителя V_1 и суммарного объема элюента V должно удовлетворять следующему условию:

$$V_1 \geqslant \frac{R_2 - R_1}{R_2} V$$

У большинства перистальтических насосов скорости потока R_1 и R_2 можно варьировать путем изменения диаметра трубок. Выпускаются насосы, позволяющие варьировать скорости потоков в широком диапазоне. Если диаметр трубок можно варьировать в ограниченных пределах, линейный градиент формируют с помощью трех каналов одинакового диаметра. По одному каналу подают буфер из сосуда *2* в сосуд *1*, а по двум остальным — буфер из сосуда *1* в колонку.

1.3.2.3. Электрофорез в полиакриламидном геле. С помощью аналитического электрофореза в присутствии 8 М мочевины идентифицируют мономеры, имеющие различные отношения от-

рицательного заряда к массе, а также делают заключение о типе ионита и pH рабочего буфера для выделения мономеров методом ионообменной хроматографии. В препаративном варианте используются условия, повторяющие аналитическую систему, или электрофоретическое элюирование (разд. 1.3.2.1).

Выбору оптимальных условий электрофореза в ПААГ посвящена работа [33]. Имеется компьютерная распечатка 5000 буферных систем для электрофоретического разделения катионов и анионов в диапазоне pH 2,5—11 [35]. На практике используются лишь немногие из этих систем с наиболее типичными pH [119]. Далее описана система, предложенная Девисом [43], несколько модифицированная путем введения 8 *М* мочевины.

Часто возникает задача определения молекулярных масс белков, которые удалось электрофоретически разделить по величине заряда. В этом случае проводят электрофорез в трубке в присутствии 8 *М* мочевины, а затем в перпендикулярном направлении в блоке в присутствии ДСН (двумерный электрофорез в геле обсуждается в разд. 7.3.2).

Электрофорез при pH 8,9 в присутствии 8 М мочевины. Методика эксперимента, аппаратура, реагенты, красители, а также способы фоторегистрации описаны в разд. 1.2.1.1 и 1.3.1.1. Далее остановимся на модифицированной системе Девиса [43].

Буфер рабочего геля: 3 *М* трис, оттитрованный HCl до pH 8,9.

Буфер формирующего геля: 0,5 трис, оттитрованный фосфорной кислотой до pH 6,8.

Буфер для приготовления образцов: 2 мл буфера формирующего геля, 6 г мочевины, 5 мл воды, 5 мг бромофенолового синего.

Электродный буфер: 0,005 *М* трис+0,04 *М* глицин.

Запасной раствор: 29,2% (масс./об.) акриламида, 0,8% (масс./об.) N,N′-метиленбисакриламида.

Соотношение компонентов для приготовления 10 мл рабочего акриламидного геля различной концентрации

	7,5%	10%	12,5%
30%-ный раствор акриламида	2,50 мл	3,33 мл	4,17 мл
Буфер для рабочего геля	1,25 мл	1,25 мл	1,25 мл
Мочевина	4,8 г	4,8 г	4,8 г
Вода	2,65 мл	1,82 мл	0,98 мл
ТЕМЕД	5 мкл	5 мкл	5 мкл
Персульфат аммония	5 мг	5 мг	5 мг

После прибавления к раствору персульфата аммония раствор деаэрируют под вакуумом водоструйного насоса и переносят в камеру для электрофореза (защищают от кислорода воздуха слоем воды или насыщенного водой изобутанола). По завершении полимеризации сливают защитный слой, поверхность промывают раствором формирующего геля и вносят пред-

варительно деаэрированный раствор формирующего геля. Для приготовления 10 мл формирующего геля смешивают 1,3 мл запасного раствора, 1,25 мл формирующего геля, 4,8 г мочевины, 3,8 мл воды, 5 мкл ТЕМЕД, 5 мг персульфата аммония.

Образцы вносят с помощью микрошприца или микропипетки. Электрофорез проводят при 100 В до прохождения зоной красителя формирующего геля, а затем при 200 В до приближения зоны красителя к нижней границе геля.

Двумерный электрофорез. Проводят электрофорез в первом направлении при pH 8,9 (или ином pH) в присутствии 8 *М* мочевины, а затем во втором направлении в присутствии ДСН. С целью сужения зон на границе геля электрофорез во втором направлении проводят в ступенчатой буферной системе. Гель из трубки помещают на слой формирующего геля в торец пластины и фиксируют с помощью агарозы (концентрация ДСН в буфере для образца 1% (масс./об.), см. разд. 1.3.1) [115]. Электрофорез во втором направлении можно вести в непрерывной буферной системе на градиентном геле, тогда сужение зон будет идти вблизи стационарного положения. В этом случае гель из трубки (диаметр 3,5 мм) уравновешивают в течение 30 мин с 100 мл электродного буфера (0,025 М фосфат, pH 7+ +0,15% ДСН) и помещают на верхний торец готовой (фирменной) пластины градиентного геля (4—27%) (разд. 1.3.1.1), которую предварительно пропитывают ДСН с помощью электрофореза при 50 мА в течение 3 ч. Разделение проводят при 30 мА в течение 15 мин и 50 мА в течение 3,5 ч [114].

1.3.2.4. Изоэлектрофокусирование. При изоэлектрофокусировании раствор, содержащий смесь амфолитов-носителей (алифатических полиаминополикарбоновых кислот), подвергают воздействию электрического поля. При этом различные компоненты смеси мигрируют в ту область, где их суммарный заряд равен нулю, т. е. вещества с низкими изоэлектрическими точками двигаются в направлении анода. В результате между электродами формируется градиент pH. Амфолиты-носители выпускаются рядом фирм (LKB, Serva, Rio-Rad, Pharmacia, Pierce). Если в систему с градиентом pH, сформированным амфолитами, вносят белок, то образец мигрирует под воздействием поля в зону, соответствующую его изоэлектрической точке. Изофокусирование позволяет наиболее точно оценить гетерогенность белков по заряду. Причину гетерогенности по заряду, о чем свидетельствует множество зон, выявить нелегко. Гетерогенность может быть обусловлена наличием в образце примесей других белков, химической модификацией белковых молекул вследствие дезамидирования, различной степенью фосфорилирования или взаимодействием цианата с N-концевой аминогруппой или

ε-аминогруппой остатков лизина. Следовательно, предварительно необходимо охарактеризовать белок электрофоретически, а затем изучать с помощью изоэлектрофокусирования. Установлено, что из 500 исследованных белков 70% имеют изоэлектрические точки в кислой области, а 38% — в области pH 4,5—6,0 [63].

Аналитическое изоэлектрофокусирование в присутствии 8 М мочевины можно проводить в обычных гелях — полиакриламидном или сефадексе. Препаративное изоэлектрофокусирование проводят в колонках в градиенте плотности (сахарозы), однако в последние годы предпочтение отдают разделению в слое сефадекса или другого носителя (методики эксперимента описаны в буклетах фирм LKB, Pharmacia).

Вначале проводят изоэлектрофокусирование в широком диапазоне pH (например, 3÷10), затем вторично — в более узком диапазоне (pH 5—7). Амфолиты-носители имеют высокую стоимость, поэтому в целях экономии разделение можно проводить вначале в трубках, а после тщательного подбора условий выполнять препаративное разделение.

Аналитическое изоэлектрофокусирование. Для приготовления 10 мл рабочего буфера смешивают 1,65 мл запасного раствора (30%-ного акриламида), 4,8 г мочевины, 3,75 мл воды, 1,0 мл раствора амфолитов, 5 мг персульфата аммония. Анодный буфер имеет состав: 0,03 *М* фосфорная кислота+8 *М* мочевина; катодный буфер — 0,05 *М* NaOH+8 *М* мочевина. Образец растворяют в буфере следующего состава: 1) 0,03 *М* фосфорная кислота+8 *М* мочевина+20%-ный глицерин (pH 4,0) или 2) 0,05 *М* трис+8 *М* мочевина+20%-ный глицерин (pH 8,0) (первый — в кислой и второй — в основной зоне геля). Проводят предварительное изоэлектрофокусирование при 400 В в течение 2 ч, наносят образцы, проводят разделение при 400 В в течение 17 ч. Гель промывают 10%-ной трихлороуксусной кислотой для удаления амфолитов, а затем проводят проявление (окрашивание). Проявление можно проводить прямым способом. Для этого гель пропитывают в течение 3 ч раствором следующего состава: 25%-ный этанол+10%-ная уксусная кислота+0,1%-ный сульфат меди+0,01%-ный кумасси голубой R-250; раствор для обесцвечивания: 10%-ный этанол+10%-ная уксусная кислота [144].

Градиент pH измеряют на неокрашенном геле с помощью контактного электрода (тип LoT 403-30, фирма Ingold). Отрезки проволоки вводят в гели с интервалом 1 см, измеряют pH, гель окрашивают и фотографируют [116]. Измерения проводят по крайней мере на трех гелях, из трех измерений находят среднее. Полученные значения изоэлектрических точек служат характеристикой белка в среде 8 М мочевины. Последнее замечание

существенно, поскольку присутствие мочевины влияет на рK ионогенных групп [28, 176].

Молекулярные массы компонентов смеси можно определить с помощью двумерного электрофореза [128] по методике, описанной в разд. 1.3.2.3.

Препаративное изоэлектрофокусирование. Установка для электрофокусирования должна обязательно включать эффективно охлаждаемую горизонтальную пластину, электродные сосуды, источник питания.

15 г ультрадекса или сефадекса IEF (сефадекс G-75 после специальной обработки) выдерживают до полного набухания в 225 мл раствора 8 М мочевины, прибавляют 12 мл раствора амфолитов и тщательно перемешивают. Затем суспензию деаэрируют и помещают в специальную кювету (например, размером 200×200×5,0 мм) в охлаждаемом блоке, выравнивают суспензию стеклянной палочкой. Избыток влаги удаляют путем естественного испарения или поглощают сухим сефадексом (открытую склянку с сефадексом накрывают марлей и фиксируют с помощью клейкой ленты на поверхности влажной суспензии). Подготовленный таким образом слой влажного геля при наклоне кюветы на 45 °С не должен смещаться.

Образец либо непосредственно наносят на поверхность геля (в виде полоски), либо после смешивания с сухим сефадексом (1 мл раствора образца в 8 М мочевине на 60 мг сефадекса) помещают в канавку, специально вырезанную в слое геля. Наносить образец можно в любой зоне рН-градиента, нагрузка составляет 1 мг белка на 1 мл суспензии геля.

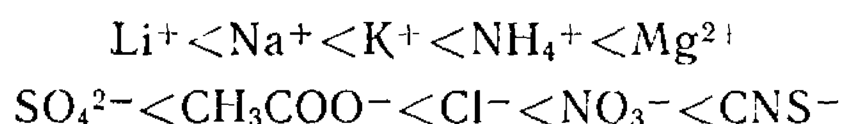
Контакт слоя геля с электродным буфером осуществляется с помощью полосок бумаги ватман 3ММ, завернутых в целлофан или диализную пленку. В зависимости от расстояния между электродами и эффективности охлаждения электрофорез проводят при 300 В в течение 16 ч, а затем при 600 В в течение 4 ч. Белковые зоны обнаруживают методом отпечатков; для этой цели лист ватмана 3ММ помещают на слой геля и прикатывают роликом. Спустя две минуты лист бумаги снимают, высушивают, дважды промывают (10 мин) 10%-ной трихлоруксусной кислотой для удаления амфолитов, промывают (5 мин) раствором для обесцвечивания с целью удаления трихлоруксусной кислоты, окрашивают кумасси голубым G-250 (разд. 1.2.1.1) (10 мин) и обесцвечивают.

Зоны, содержащие исследуемые белки, извлекают, переносят в небольшую колонку (например, небольшой шприц с кусочком стекловаты), суспендируют в буфере. Амфолиты отделяют диализом или гель-фильтрацией на сефадексе G-10.

Иногда примеси амфолитов удаляются с трудом и мешают биологическому тестированию. В таких случаях следует испы-

тать систему буффалит (Buffalyte), поставляемую фирмой Pierce [139]. Более детально методика работы обсуждается в ряде публикаций [140, 141] и в буклетах фирм-поставщиков.

1.3.2.5. Фракционное осаждение. Нейтральные соли оказывают специфическое и глубокое воздействие на конформационную стабильность белков [179], причем катионы и анионы, как правило, по-разному влияют на развертывание нативных структур. В то время как в присутствии небольших количеств солей растворимость белков возрастает (так называемый солевой эффект), при высоких концентрациях (обычно несколько молей) имеет место явление высаливания, которое и вызывает осаждение белков. Относительная эффективность нейтральных солей в реакции высаливания впервые была изучена в 1888 г. [79]. Предложены лиотропные ряды катионов и анионов:



$$Li^+ < Na^+ < K^+ < NH_4^+ < Mg^{2+}$$

$$SO_4^{2-} < CH_3COO^- < Cl^- < NO_3^- < CNS^-$$

Физико-химические основы явления высаливания белков в концентрированных растворах солей достаточно сложны [163]. Одна из причин высаливания связывается со снижением активности ассоциированных с белком молекул воды, с их более слабым взаимодействием с полярными группами белка. К существенным факторам, определяющим растворимость белка, относят также поверхностное натяжение на границе между белковыми молекулами и на поверхности раздела белок — вода, причем лиотропный эффект объясняют влиянием посторонних ионов на величину поверхностного натяжения [27]. Растворимость S многих белков (при высокой солевой концентрации) уменьшается по мере увеличения концентрации соли по логарифмической зависимости:

$$\lg S = \beta - K_S \omega$$

где β — растворимость белка в воде (находят обычно путем экстраполяции к $\omega = 0$), K_s — константа высаливания, ω — ионная сила. Зависимости, приведенные на рис. 1.5, иллюстрируют изменение растворимости ряда белков в растворах сульфата аммония [36]. Как правило, наиболее полное осаждение белка наблюдается вблизи его изоэлектрической точки, однако это выполняется далеко не всегда.

Осаждение сульфатом аммония часто применяется в качестве предварительной стадии очистки белка, например с целью концентрирования или отделения от сопутствующих примесей. Иногда этот прием может оказаться полезным при разделении субъединиц, в частности если они имеют различную растворимость в сульфате аммония (или в растворах других солей).

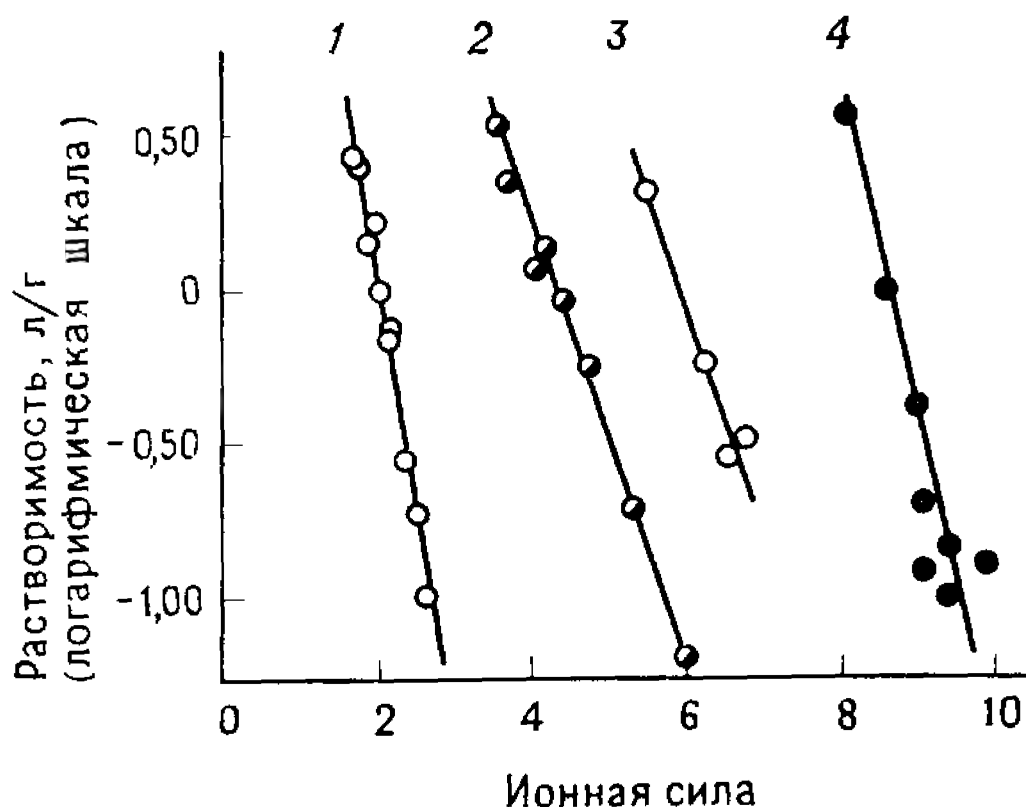


РИС. 1.5. Изменение растворимости белков в растворах сульфата аммония. 1 — фибриноген; 2 — гемоглобин; 3 — сывороточный альбумин; 4 — миоглобин [36].

Однако даже в благоприятных случаях осаждение приходится повторять, чтобы уменьшить возможное соосаждение других субъединиц. Сульфат аммония обладает несомненными преимуществами перед другими нейтральными солями: он имеет высокую высаливающую способность, не денатурирует белки, обладает низкой стоимостью и доступен в достаточно очищенной форме, хорошо растворим в воде, при растворении выделяется мало тепла. Кроме того, концентрированные растворы сульфата аммония имеют небольшую вязкость и плотность, что немаловажно, поскольку последующей стадией является ультрацентрифугирование.

На практике для достижения оптимальных результатов приходится действовать методом проб и ошибок. Вначале строят градуировочный график в определенной области концентраций сульфата аммония с учетом того, что сульфат аммония несколько снижает pH незабуференных растворов. Величина «процента насыщения» (100%-ное насыщение соответствует 4,05 М раствору при 20 °С), характеризующая поведение конкретного белка, сильно варьирует в зависимости от свойств белка, его концентрации, pH (обычно pH 5,5—7,5) и температуры раствора (обычно 20 °С). При приготовлении растворов сульфата аммония можно руководствоваться номограммой, приведенной в работе [48]. По номограмме легко определить количество соли, которое необходимо прибавить к определенному объему раствора для достижения нужной степени насыщения. В области pH<5 удается проводить осаждение белков при более низких концентрациях соли (такие растворы имеют более низкую плотность, что улучшает условия разделения фаз при центрифугировании).

Разделение с помощью органических растворителей. Белки можно фракционировать с помощью осаждения органическими растворителями, например этанолом, ацетоном. Белки, склонные к агрегации, осаждают сульфатом аммония в присутствии пропанола [51]. Органические растворители снижают растворимость белков благодаря изменению диэлектрической проницаемости среды. Поскольку причина осаждения состоит в агрегации молекул вследствие электростатического взаимодействия, что аналогично осаждению в изоэлектрической точке, pH в данном случае более важный фактор, чем при осаждении солями. Следовательно, с помощью органических растворителей можно разделить очень близкие в структурном отношении белки, имеющие разные изоэлектрические точки. Например, при pH 6,5 парвальбумины II, III и IV были разделены путем осаждения ацетоном [163]. Белок IV выпадал в осадок при концентрации ацетона 55—60%, белки III и IV — при концентрации 60—65%, белки III и II — при концентрации 65—70%, наиболее кислотные компоненты смеси с изоточками $pK \sim 4$ выпадали в осадок при концентрации ацетона 70—80%.

Как правило, чем ниже молекулярная масса белка, тем выше концентрация органического растворителя, необходимая для его осаждения. Если концентрация растворителя слишком велика, осаждение может быть затруднено из-за белок-белкового взаимодействия. В этом случае в раствор добавляют биполярные вещества, например глицин, которые выполняют роль буфера и стабилизируют диэлектрическую проницаемость. Если белок денатурирует при комнатной температуре, осаждение проводят при пониженной температуре (при 0 °C). Прибавление к раствору белка органического растворителя вначале вызывает постепенное повышение температуры (до достижения 20%-ной (об./об.) концентрации), иногда уменьшение объема. Важно в процессе осаждения поддерживать постоянную температуру раствора, поскольку растворимость белков сильно снижается при охлаждении.

В этом отношении осаждение органическими растворителями отличается от фракционирования с помощью солей, при котором зависимость растворимости от температуры не столь однозначна.

1.3.2.6. Прочие методы разделения. Здесь следует назвать прежде всего аффинную хроматографию, которая обсуждается в гл. 5.

1.4. Стехиометрическое соотношение мономеров в олигомере

Для определения стехиометрического содержания мономеров в олигомерных белках используется ряд методов. Выбор метода анализа определяется как особенностями состава олигомера,

так и техническими возможностями исследователя. Ввиду трудоемкости многих методов и недостаточной достоверности получаемых таким образом результатов при анализе состава олигомера надо сопоставлять данные разных методов. Часто соотношение мономеров рассчитывают на основании молекулярных масс интактного олигомера и составляющих его мономеров. Все более широкое применение находит модификация субъединиц путем сшивания бифункциональными реагентами. С целью получения гибридных олигомеров, которые затем исследуют методом электрофореза в ПААГ, проводят конденсацию мономеров, выделенных из других биологических видов или предварительно модифицированных химическими реагентами. Применение таких искусственных приемов, как получение гибридных олигомеров и сшивания мономеров, обычно ограничено олигомерами небольшого размера, включающими несколько субъединиц. Для исследования олигомеров, состоящих из субъединиц разных типов, используют метод диссоциации с последующим анализом методом электрофореза в ПААГ, денситометрию белков, окрашенных кумасси, введение радиоактивной метки. Если удалось оценить молекулярные массы олигомера и мономеров, несложно рассчитать абсолютное количество субъединиц. С целью определения соотношения мономеров может применяться и аминокислотный анализ.

Поскольку при определении молекулярных масс белков ошибки могут достигать существенной величины, полученные данные следует оценивать с известной осторожностью. Важное значение имеет симметрия молекулы олигомера. Наиболее часто встречаются димерные и тетрамерные структуры, вместе с тем есть множество примеров гексамеров, октамеров и додекамеров. Известно всего несколько работ, где упоминается о существовании тримеров, пентамеров и гептамеров [63]. Таким образом, если расчеты показывают, что олигомер включает одиннадцать мономеров, вероятнее всего, мы имеем дело с артефактом. О структуре крупных олигомеров судят по данным рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии [13, 131].

1.4.1. Определение состава олигомера по молекулярным массам мономеров

Если молекулярные массы олигомера и мономера установлены, например с помощью методов, рассмотренных в разд. 1.2 и 1.3.1, состав олигомера рассчитать несложно. Например, если олигомер с молекулярной массой M_r включает мономеры двух типов α и β (молекулярные массы M_α и M_β), то состав его рассчитывают по формуле

$$n_\alpha M_\alpha + n_\beta M_\beta = M_r$$

где n_α и n_β — число субъединиц α и β. Следует помнить, что даже в самых благоприятных случаях ошибка определения молекулярных масс олигомера и мономеров составляет 5—10%. Кроме того, следует критически относиться к абсолютной точности таких эмпирических методов, как электрофорез в ПААГ — ДСН и гель-фильтрация. Исследуемые белки могут иметь иные по сравнению с белками-маркерами гидродинамические свойства или необычный состав, что существенно повлияет на их поведение в процессе анализа.

Рассмотрим, в какой мере ошибки в 5 и 10% повлияют на оценку числа субъединиц. Для олигомера с молекулярной массой 300 000, содержащего 6 субъединиц с молекулярной массой 50 000, при ошибке в 5% расчет дает величину 5,4—6,6, и, следовательно, с достаточной достоверностью можно считать, что речь идет о гексамере. Однако при ошибке 10% расчет дает величину 4,9—7,3, т. е. число мономеров можно принять равным 4, 6 или 8. Достоверность определения стехиометрического соотношения мономеров ухудшается, если в состав олигомера входит 2 и более различных типов мономеров.

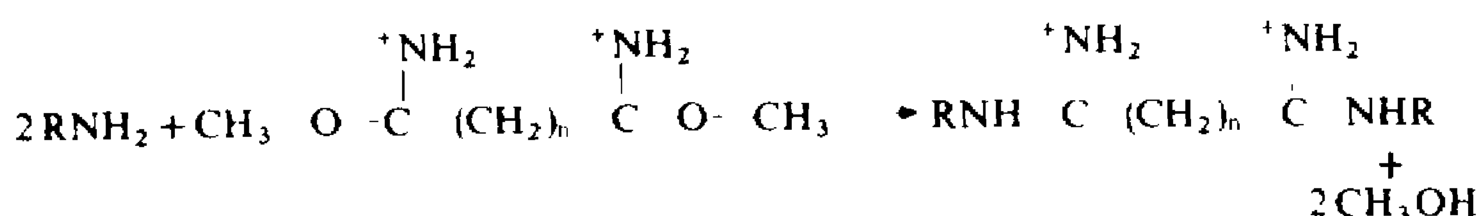
1.4.2. Сшивание субъединиц бифункциональными реагентами

При определении числа мономеров в олигомере все большее распространение получает метод, основанный на сшивании мономеров бифункциональными реагентами с последующим анализом продуктов реакции с помощью электрофореза в ПААГ — ДСН [44]. Электрофореграмма представляет собой набор зон, соответствующих компонентам смеси, молекулярные массы которых кратны молекулярной массе мономера вплоть до полного олигомера. В случае олигомеров, составленных из идентичных или почти идентичных мономеров, число основных зон должно соответствовать набору мономеров.

С помощью бифункциональных реагентов можно определять четвертичную структуру олигомеров [72, 82], однако этот вопрос требует специального обсуждения. Тем не менее, когда речь идет о простой системе — тетрамере, гексамере или октамере,— имеет смысл использовать такой подход для определения расположения мономеров в олигомере.

В подавляющем большинстве экспериментов в качестве сшивающего агента используются бисиминоэфиры карбоновых кислот с различной длиной цепи, и в первую очередь диметиловый эфир иминопробковой кислоты ($n=6$). Эти высокоспецифические модифицирующие реагенты легко взаимодействуют с α- и ε-аминогруппами остатков лизина с образованием амидинов ($pK_\alpha > 11$). Реагенты иного типа включают ацилазиды, реагенты на сульфгидрильные группы, глутаровый альдегид [132]. При-

меняют также относительно устойчивые бисиминоэфиры янтарной кислоты, образующие стабильные или гидролизуемые поперечные связи [77].



Бисиминоэфиры гидролизуются в растворе по двум или одной функциональной группе, тогда как другая может быть связана с аминогруппой белка. Некоторые молекулы реагента взаимодействуют с двумя молекулами белка, образуя как внутри-, так и межмолекулярные ковалентные связи [132].

На молекулярную массу конечного продукта существенное влияние оказывают только межмолекулярные связи, что легко обнаружить в денатурирующих условиях. Поперечные связи в пределах субъединиц (аналогично дисульфидным связям) удерживают полипептидную цепь в свернутом состоянии, уменьшая тем самым гидродинамический объем и кажущуюся молекулярную массу. Некоторые из продуктов, полученных при сшивании тетрамеров типа α_4 и $\alpha_2\beta_2$, представлены на рис. 1.6. Распределение полимеров по молекулярным массам определяется числом и положением поперечных связей.

Тем не менее по «спектру» молекулярных масс перекрывающихся полимеров можно определить число мономеров в простом олигомере. Олигомеры, составленные из мономеров с различными молекулярными массами (например, типа $\alpha_2\beta_2$), образуют более сложный набор полимеров, и интерпретация полученных результатов бывает затруднительна.

1.4.2.1. Условия проведения реакции белков с бифункциональными реагентами. При взаимодействии белков с бифункциональными реагентами могут меняться pH среды, расстояние между функциональными группами реагента, концентрация реагента и белка.

Влияние pH среды. Бисиминоэфиры взаимодействуют с ε-аминогруппами остатков лизина (pK_α 9,5—10) и α-аминогруппой N-концевой аминокислоты при pH>8, т. е. с аминогруппами, находящимися в непротонированной форме. Продукты этих реакций — амидины с pK_α>11, поэтому в области pH<8 модифицированный белок сохраняет положительный заряд. В области pH≤8 возможны побочные реакции [132, 165], в то время как выход амидинов достигает максимума при pH≥10. В этих условиях многие олигомеры диссоциируют, поэтому реакцию рекомендуется проводить в диапазоне pH 8—10. Если

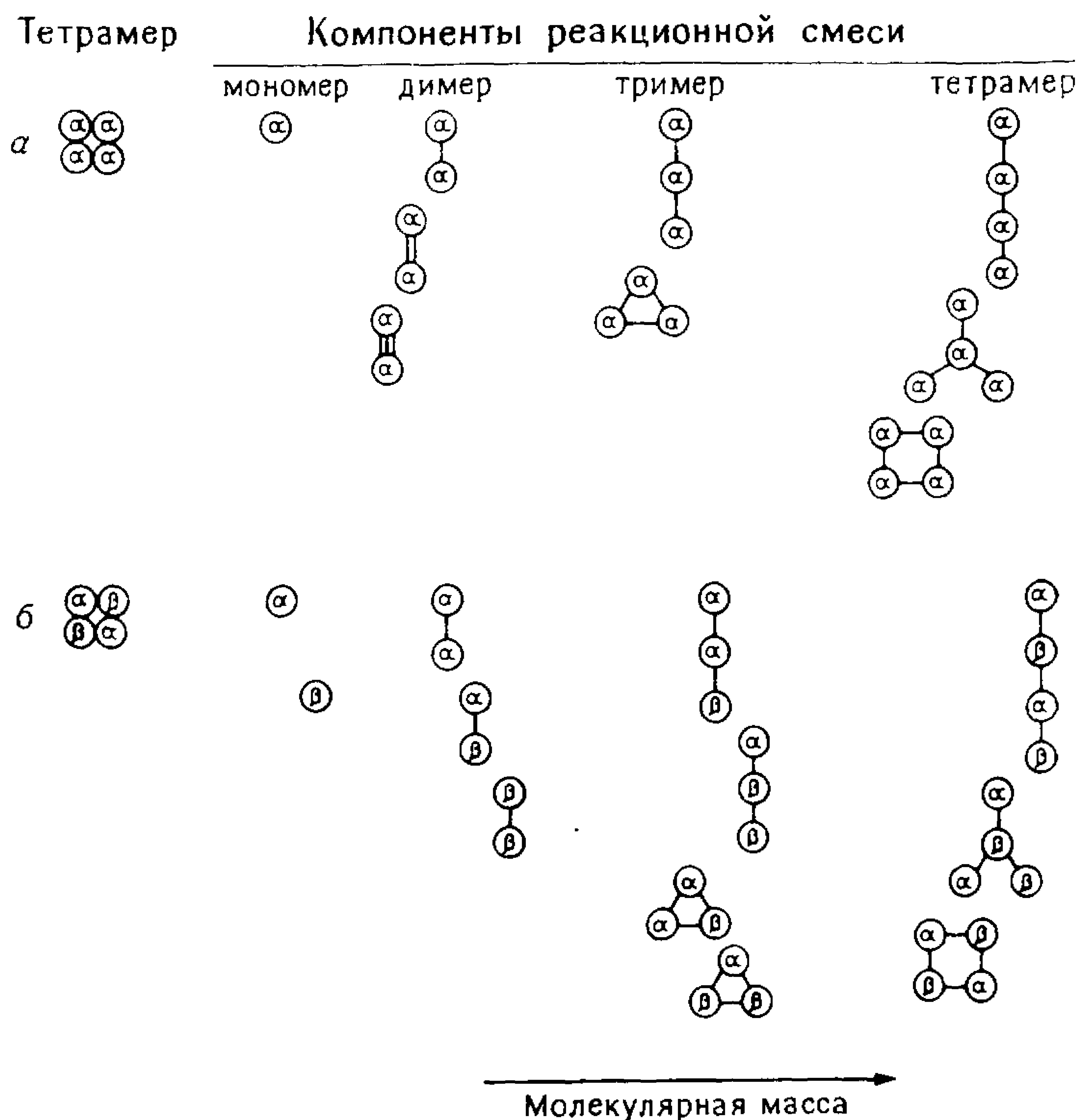


РИС. 1.6. Состав смеси полученной при частичном сшивании бифункциональными реагентами тетрамеров α_4 и $\alpha_2\beta_2$.

олигомер устойчив при высоких pH хотя бы в течение 1—2 мин, то, поскольку реакция идет с высокой скоростью, вполне возможно проводить модификацию в этой среде. Вообще говоря, имеет смысл изучать роль pH среды, исследуя состав продуктов реакции [162, 171].

Расстояние между функциональными группами реагента. Расстояние между функциональными группами выбранного реагента определяется расположением аминогрупп в нативном олигомере. Известные бифункциональные реагенты — диметиловые эфиры двухосновных иминокарбоновых кислот — имеют следующие параметры [45, 132]:

Кислота	*Расстояние между функциональными группами, нм*
Иминомалоновая	0,5
Иминоянтарная	0,6
Иминоадипиновая	0,9
Иминопробковая	1,1
Иминододециловая	1,5

При работе с одним реагентом можно прийти к неоднозначным или даже ошибочным выводам. Лучше всего проводить исследования с несколькими реагентами — членами одного гомологического ряда.

Концентрация бифункционального реагента. От концентрации бифункционального реагента непосредственным образом зависит степень сшивки олигомера, иными словами, чем выше концентрация, тем выше степень сшивки. Однако отмечено [132], что избыток сшивающего реагента по отношению к количеству олигомера не оказывает существенного влияния на скорость реакции, а чрезмерный избыток, по-видимому, вызывает протекание нежелательных побочных реакций. Если, увеличивая концентрацию реагента, не удается повысить степень сшивки олигомера до желаемого значения, это может свидетельствовать о преимущественном образовании внутримолекулярных поперечных связей.

Концентрация белка. Во избежание полимеризации олигомеров концентрация белка в реакционной смеси должна быть низкой. Если известна молекулярная масса олигомера, то признаком образования межмолекулярных (между молекулами олигомера) связей будет присутствие в смеси компонентов с молекулярной массой, превышающей *M* олигомера. Воспрепятствовать образованию поперечных связей (сшивок) олигомеров можно с помощью предварительной иммобилизации белка на нерастворимой матрице [135], например благодаря образованию дисульфидной связи с тиольными группами сефарозы 4B (разд. 3.2.5); далее можно провести обработку бисиминоэфирами [32].

1.4.2.2. Методики.

Получение бисиминоэфиров [108]. Диметиловые эфиры иминоадипиновой и иминопробковой кислот поставляются в качестве продажных реактивов. Остальные бисиминоэфиры могут быть синтезированы из доступных динитрилов по типовой методике [108].

Растворяют 0,5 г нитрила пробковой кислоты в смеси 2 мл метанола (высушенного с помощью молекулярного сита) и 15 мл этилового эфира при 0 °C. Через раствор в течение 30 мин пропускают сухой HCl и выдерживают реакционную смесь при 4 °C в течение 24 ч. Прибавляют 10 мл сухого диэтилового эфира, выпавшие кристаллы тщательно промывают сухой смесью метанол — эфир (1 : 3) без доступа влаги. Полученный гидрохлорид бисиминоэфира (выход 0,81 г, 81 %) используется без дополнительной перекристаллизации.

Получение амидинированных белков [44]. Образец белка растворяют (до концентрации 0,5 мг/мл) или тщательно диали-

зуют против буферного раствора состава: 0,2 М триэтаноламин+HCl (pH 8,5). Непосредственно перед проведением реакции растворяют гидрохлорид бисиминоэфира в том же буфере (концентрация 10 мг/мл) и с помощью NaOH устанавливают pH 8,5. Рассчитанное количество раствора реагента прибавляют к раствору белка (так, чтобы концентрация реагента в реакционной смеси составила 1 мг/мл) и выдерживают реакционную смесь при 20 °C в течение 3 ч. Если реагент необходимо прибавлять порциями, то вторую порцию вносят спустя 30 мин после начала реакции.

При поиске оптимальных условий проведения реакции концентрацию белка варьируют в интервале 0,1—5,0 мг/мл, а концентрацию бисиминоэфира в реакционной смеси — 0,2—5 мг/мл. Величину pH буферного раствора можно варьировать от 8 до 10,5. При pH 8—8,5 используют 0,2 М триэтаноламин — HCl, при pH>8,5 — 0,2 М боратный буфер. Для повышения буферной емкости (сохранения pH при добавлении реагентов) используют довольно концентрированные буферные растворы, которые не должны содержать первичных аминов.

Спустя три часа избыток реагента полностью гидролизуется. При определении кинетики реакции отбирают аликвотные пробы, а реакцию прерывают, добавляя двукратный избыток (по отношению к реагенту) гидроксиламина.

Электрофорез в ПААГ — ДСН. Продукты реакции исследуют с помощью электрофореза в ПААГ-ДСН (разд. 1.3.1.1) или с помощью гель-фильтрации и ультрацентрифугирования в присутствии денатурирующих агентов. Поскольку, по всей вероятности, поперечно-сшитые продукты будут иметь $M>100\,000$, готовят 5%-ный гель, а образец наносят в количестве 50 мкг. В случае простых олигомеров, содержащих идентичные или почти идентичные мономеры, состав определяют по количеству основных зон. Если степень сшивки невелика, молекулярные массы гибридных молекул, кратные молекулярной массе мономера, можно найти по градуировочному графику. Высокое содержание поперечных связей может быть причиной аномального поведения полимеров при электрофорезе.

Если концентрация белка в образце достаточно высока, пробу наносят (в случае использования ступенчатой системы) без предварительного диализа. Возможно, что образец будет необходимо сконцентрировать, лучше всего это сделать путем осаждения трихлороуксусной кислотой. Осадок растворяют в буфере для образца (раздел 1.3.1.1).

1.4.2.3. Ограничение возможностей метода. С помощью сшивания бифункциональными реагентами был изучен ряд олигомерных белков известного состава. В принципе метод может при-

меняться в отношении любого олигомерного белка, однако иногда таким путем не удается получить необходимой информации. Образование поперечных связей может не идти из-за недостатка аминогрупп, их неудачного расположения, наличия защитных группировок. Неудача может быть обусловлена качеством реагента, например недостаточной длиной углеводородной цепочки и присутствием в качестве примеси монофункционального производного.

Некоторые олигомерные белки не образуют гибридных молекул по неизвестной причине [82], правда, в отдельных случаях отсутствие связывания мономеров является отражением неблагоприятной локальной геометрии полипептидной цепи [135]. На основании подобного рода отрицательных результатов не следует делать категорических выводов [132].

На диссоциацию и сборку олигомерного белка может оказывать влияние pH среды, и этот фактор может быть причиной получения недостаточно четких данных. Замечено [171], что в некоторых случаях конформация мономера может в такой степени зависеть от pH среды, что реакция со сшивающими агентами вообще не идет.

Область применения метода ограничена олигомерами с молекулярной массой не более 500 000, поскольку эта величина является верхним пределом разрешения с помощью электрофореза в ПААГ-ДСН.

1.4.3. Гибридизация

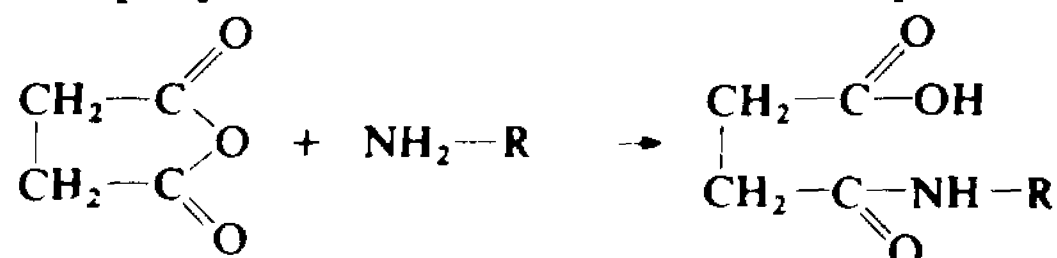
Сведения о субъединичном составе олигомеров могут быть получены по результатам гибридизации in vitro двух различных очищенных форм белка. Это могут быть гомологичные белки, изоферменты или олигомеры, модифицированные химическим путем; важно только, чтобы две формы белка имели какие-либо отличительные признаки, по которым можно было бы различать и определять полученные гибридные молекулы. По количеству образующихся гибридов можно определить число мономеров в олигомере. Например, можно предположить, что при сборке тетрамера из идентичных субъединиц α и β могут возникать пять различных комплексов: $\alpha\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\beta\beta$, $\alpha\beta\beta\beta$ и $\beta\beta\beta\beta$.

Если мономеры не идентичны (в частности, аспартаттранскарбамилаза содержит 6 каталитических и 6 регуляторных субъединиц), задача существенно сложнее. Если субъединицы разные, но в структурном и функциональном отношении эквивалентны, то количество N возможных гибридов определяется следующей формулой:

$$N = \frac{(m+s-1)!}{s!\,(m-1)!}$$

где s — число субъединиц, а m — суммарное число различных типов единиц.

Часто исследователь не располагает гомологичными белками (или изоферментами), необходимыми для гидридизации; поэтому в более общем случае рекомендуется химическая модификация. При исследовании субъединичной структуры альдолазы модификацию проводили с помощью янтарного ангидрида [120]. В результате положительно заряженные остатки



лизина приобретали отрицательный заряд. Могут быть использованы также ангидриды других дикарбоновых кислот, однако реакция с ними обратима. Такой способ модификации субъединиц может привести к диссоциации олигомера из-за электростатического отталкивания одинаково заряженных группировок. Проблему диссоциации можно решить путем частичного ацилирования янтарным ангидридом, однако при этом возникает задача получения гомогенных препаратов. Метод гибридизации не дает результатов, если до и после модификации белок имеет разную четвертичную структуру или его вообще не удается реконструировать после диссоциации на мономеры.

1.4.3.1. Методики. Далее в качестве примера приводятся две различные методики сборки гибридных белков из гомологов и химически модифицированных субъединиц.

Гибридизация гемоглобина [178]. Смесь гемоглобина S и радиоактивно меченного гемоглобина A (1 : 1) с целью диссоциации на α- и β-цепи диализуют при 3 °C в течение 48 ч против 0,1 M натрийацетатного буфера (pH 5). Сборку проводят путем повторного диализа против дистиллированной воды в течение 24 ч. Хроматографическим путем получают радиоактивно меченный гемоглобин S — гибридный белок, образованный в результате обмена α-цепями гемоглобина A и S.

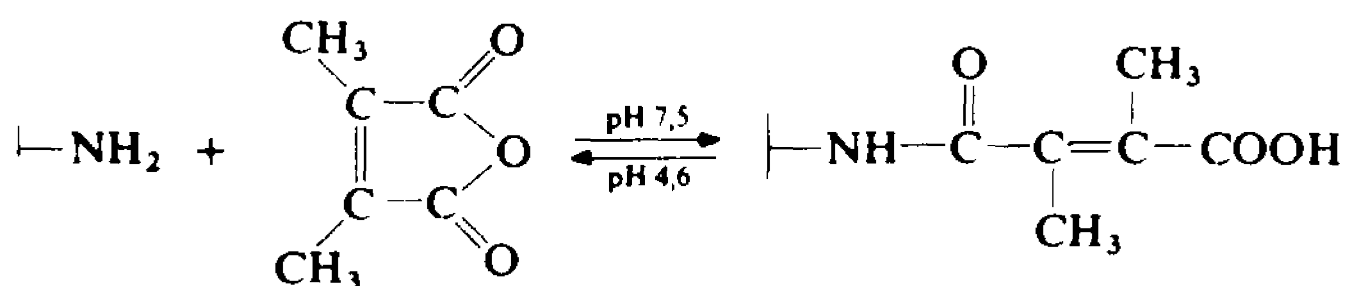
Гибридизация альдолазы [120]. Смешивают в различных мольных соотношениях нативную и ацилированную (янтарным ангидридом) альдолазу (концентрация белка 0,4%) в 0,02 M калийфосфатном буфере (pH 6,5), содержащем 4,0 M мочевину, 0,002 M ЭДТА и 0,1 M дитиотреит при 4 °C. Спустя 30 мин образцы диализуют в течение 12 ч для удаления мочевины против буфера, содержащего 0,5 M NaCl, 0,2 мM дитиотреит, затем 2—3 раза против буфера, не содержащего NaCl.

1.4.4. Диссоциация и сборка

Третичная и четвертичная структуры олигомеров нарушаются в присутствии мочевины, гуанидингидрохлорида и ДНС (разд. 1.3) и в результате химической модификации (разд. 1.4.3).

Идентифицируя продукты диссоциации, можно определить соотношение мономеров в олигомере. Существенное значение может иметь pH среды. Например, агглютинин проростков пшеницы и его сукцинилпроизводное при pH>5 — димеры, но диссоциируют при pH<5 [122]. Зависимость четвертичной структуры от pH определяет условия сборки и реконструкции белка. Гемоцианин, агрегат из 8 гексамеров, диссоциирует на мономеры и димеры при pH 8,9 (в присутствии ЭДТА для связывания Ca^{2+}). Напротив, при изменении ионной силы, pH и концентрации Ca^{2+} гемоцианин диссоциирует с образованием комплексов гексамера промежуточного размера [20].

Дополнительные возможности метода, основанного на химической модификации, рассмотрены в работе [184] на примере мультиферментного комплекса дрожжевой синтетазы жирных кислот. При этом вместо янтарного ангидрида, который необратимо ацилирует остатки лизина, предложено использовать ангидриды других дикарбоновых кислот, цитраконовый или лучше диметилмалеиновый ангидрид. В отличие от цитракониламидов диметилмалеилмоноамиды могут легко гидролизоваться в мягких условиях. После ацилирования диметилмалеиновым ангидридом α- и β-полипептидные цепи диссоциируют при повышении pH или снижении ионной силы. Реакция ацилирования обратима в слабокислой среде (pH 4,6), что допускает последующую сборку олигомера. Именно потому, что нативная конформация мономерных ферментов относительно легко реконструируется (разд. 1.5.1.3), по-видимому, как термодинамически



наиболее выгодная, можно показать, что олигомерные ферменты сохраняют специфичность in vitro после обратимой денатурации и последующей реконструкции [39].

Для отдельных олигомеров существенное значение могут иметь параметры среды, например величина pH. После диссоциации фумаразы в мочевине [186] и диализа против воды не происходит сборки активного тетрамера, однако реконструкция удается при диализе против буфера в отсутствие мочевины (разд. 1.4.4.1). Первоначально образующийся продукт обладает частичной активностью и является в основном димером, хотя данные флуоресценции и кругового дихроизма совпадают с соответствующими параметрами нативного тетрамера.

1.4.4.1. Методики. Ниже приводятся методики диссоциации и реконструкции конкретных ферментов с использованием денатурирующих агентов (пример 1) и химической модификации (пример 2).

Пример 1 [186]. Фумаразу из сердца свиньи (0,5—5 мкг/мл) инактивируют при 25 °С в течение 30 мин в присутствии 6 *М* мочевины (или гуанидин-HCl) в растворе следующего состава: 50 м*М* фосфатный буфер (pH 7,3)+6 *М* мочевина (или гуанидин-HCl)+10 м*М* дитиотреит+0,1 м*М* ЭДТА+10%-ный глицерин+200 м*М* KCl.

Затем раствор диализуют против исходного буфера, но не содержащего мочевину, при 4 °С в течение 24 ч, а затем инкубируют при 25 °С в течение 3 ч.

Пример 2 [184]. К раствору синтетазы жирных кислот (5—6 мг/мл) в 0,3 *М* калийфосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 10 м*М* 2-меркаптоэтанол, прибавляют 13 мкл свежеприготовленного 0,8 *М* раствора диметилмалеинового ангидрида в сухом тетрагидрофуране. Смесь инкубируют при 0 °С в течение 30 мин, а затем диализуют против 100 м*М* трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 1 м*М* дитиотреит. Для обессоливания используют гель-фильтрацию на сефадексе G=50.

Реактивация фермента. Прежде всего с помощью гидролиза в мягких условиях снимают ацильные группы модифицированных аминокислот. Раствор белка разбавляют вдвое 0,2 *М* трис-ацетатным буфером (pH 8,1). При содержании белка <1 мг/мл в раствор добавляют бычий сывороточный альбумин до суммарной концентрации белка 1 мг/мл. Раствор осторожно титруют при комнатной температуре насыщенным (при 23 °С, 100%-ное насыщение) сульфатом аммония, подкисленным до pH 2 концентрированной серной кислотой. Белок начинает выпадать в осадок при pH ~6,5. Суспензию выдерживают при pH 4,6 и комнатной температуре в течение 30—60 мин, а затем центрифугируют при 28 000 *g* и 4 °С в течение 30 мин. Осадок ресуспендируют в охлажденном до 4 °С буфере следующего состава: 100 м*М* калийфосфат (pH 8,5)+10 м*М* дитиотреит+0,5 м*М* калий ЭДТА+10 мк*М* флавинмононуклеотид. Небольшая примесь бычьего сывороточного альбумина (0,1 мг/мл) способствует растворению осадка. Сульфат аммония удаляют с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 в указанном буфере. Обессоленный образец (1—2 мг/мл) инкубируют в буфере для реактивации при 25 °С.

1.4.5. Электрофорез в полиакриламидном геле

Если олигомер включает два и более различных типов мономеров (или полипептидных цепей), которые могут быть разделены электрофорезом в ПААГ, то стехиометрическое содержание субъединиц можно определить денситометрией или с помощью введения радиоактивной метки. Предварительно субъединицы выделяют в очищенном состоянии и определяют в молекуле содержание остатков меченых аминокислот; в случае денситометрии строят градуировочные графики связывания красителя.

1.4.5.1. Введение радиоактивной метки. Каждая субъединица исследуемого белка должна содержать по крайней мере один аминокислотный остаток, по которому можно ввести радиоактивную метку. С целью повышения чувствительности рекомендуется вводить метку по нескольким точкам. Введение метки

проводят в жестких денатурирующих условиях, когда все аминокислотные остатки включают метку в равной степени. Более того, реакция модификации должна быть специфичной и проходить с предельной полнотой. При этом важно, чтобы аминокислотные остатки сохранили заряд. Если же заряд изменился, то необходимо специально исследовать возможность отделения модифицированных немеченых субъединиц с помощью электрофореза.

Большинство белков содержат достаточно много остатков лизина, которые могут быть специфически помечены путем образования амидинов без изменения заряда. Условия проведения реакции выбирают такими, чтобы N-концевые аминокислотные остатки не затрагивались. Другим возможным объектом модификации могут служить остатки цистеина. Соответствующие реакции рассматриваются в разд. 1.5.1. Наибольший интерес из них представляет алкилирование иодоуксусной кислотой или иодоацетамидом. В случае иодоуксусной кислоты белок приобретает дополнительный отрицательный заряд. С целью введения метки можно восстановить дисульфидные связи, а затем провести алкилирование. Если мономер включает полипептидные цепи, связанные дисульфидными связями, этот метод неприменим. С помощью введения метки можно определять внутри- и межцепочечные дисульфидные связи, проводя модификацию в обычных и денатурирующих условиях. Межцепочечные связи сывороточной холинэстеразы человека были восстановлены и алкилированы в отсутствие денатурирующих агентов [106].

Если предположить, что модификация различных мономеров проходит одинаково, то радиоактивность D_i (расп./мин) мономера i пропорциональна молярному содержанию X_i мономера и содержанию L_i потенциально модифицированных групп в 1 моле мономера i:

$$D_i \propto L_i \cdot X_i$$

Для определения L_i устанавливают аминокислотный состав и молекулярную массу очищенных мономеров. Для любых двух мономеров i и j справедливо

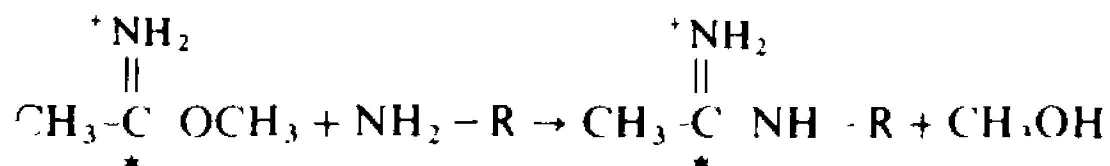
$$\frac{X_i}{X_j} = \frac{D_i \cdot L_j}{L_i \cdot D_j}$$

Введение радиоактивной метки. Методика алкилирования остатков цистеина иодоуксусной кислотой описана в разд. 2.2.1.1. Меченая [^{14}C]иодоуксусная кислота может быть разбавлена немеченым реагентом.

Известен метод пептидных карт, включающий операции амидинирования белка метил[^{14}C]иминоацетатом, электрофорез в тонком слое, хроматографию и авторадиографию [17].

Амидинирования белков. [16]. Образцы белка (до 1 мг) диализуют против 1 мМ ЭДТА (pH 7,0) и высушивают лиофильно. Сухой остаток раство-

ряют в 0,1 мл 0,2 М натрийборатного буфера (pH 8,5), содержащего 5 М гуанидин-HCl, 2 мМ ЭДТА и 0,01%-ный (масс./об.) азид натрия; добавляют 0,01 мл 1 М раствора метил-1-[[14]C]иминоацетата (концентрация реагента в



реакционной смеси 0,1 моль/л) и инкубируют при комнатной температуре в течение по крайней мере 5 ч. После включения метки образец разбавляют до необходимой концентрации и проводят электрофорез в ПААГ. Образец может быть диализован против электрофоретического буфера с целью удаления избытка радиоактивно меченных примесей.

Измерение радиоактивности [16]. По завершении электрофореза белковые зоны проявляют (окрашивают), вырезают, помещают в пластмассовые пробирки для измерения скорости счета и высушивают в вакууме. Высушенный гель выдерживают в 0,3 мл 30%-ного H_2O_2, содержащего 1% NH_4OH, при 60 °C в течение 6 ч до полного растворения. В контрольных опытах было показано, что при этом не происходит потери метки. Добавляют сцинтиллятор [3,0 мл смеси толуол — тритон 2 : 1)], содержащий 2,5-дифенилоксазол (5 г/л), и измеряют скорость счета. В качестве внешнего стандарта используется ^{133}Ba. Эффективность счета составляет обычно 70—75%. Для определения фона используют кусочки геля без метки, обработанного аналогичным образом.

1.4.5.2. Денситометрия. Для обнаружения белков в геле часто используют краситель кумасси, однако при высоких концентрациях белка наблюдаются отклонения от закона Бэра. Зависимость оптической плотности от концентрации линейна при концентрациях белка 1—50 мкг; влияют тип белка, размеры геля и длина электрофоретического пробега зоны. Денситометрия окрашенных зон невозможна, если зоны сильно отличаются по содержанию белка. Способность связывать молекулы красителя сильно варьирует у различных белков. Полагают, что связывание красителя основано на электростатическом взаимодействии между молекулой красителя и основными группами белка (т. е. основные белки окрашиваются более интенсивно по сравнению с кислыми), однако, вполне возможно, имеет место и гидрофобное взаимодействие. Вследствие этого необходимо определять связывающую способность каждого исследуемого белка.

Методика. Электрофорез проводят в пластине геля; в лунки вносят пробы исследуемого белка (например, 1, 2, ..., 40 мгк); исходную концентрацию белка определяют рефрактометрически, взвешиванием, спектрофотометрически или по данным аминокислотного анализа; гель окрашивают по методике, описанной в разд. 1.2.1.1. Каждый трек сканируют на денситометре при λ_{max}=590—595 нм (λ_{min}=400 нм). Площадь пика определяют с помощью интегратора или путем взвешивания диаграммной бумаги, ограниченной кривой [61]. В области

сохранения закона Бера строят градуировочный график в координатах длина пробега зон — молекулярная масса белка. Окрашивание и обесцвечивание (разд. 1.2.1.2) гелей следует стандартизировать, в противном случае площадь пика на единицу массы белка сильно варьирует для каждого геля. Диссоциированный олигомер следует разделять в том же геле. По результатам анализа диссоциированного олигомера определяют соотношение мономеров по массе. По этому соотношению с учетом молекулярной массы мономеров рассчитывают молярный состав олигомера.

1.4.6. Аминокислотный анализ

Соотношение различных мономеров (или полипептидных цепей) в олигомере можно рассчитать по данным аминокислотного анализа. Этот метод особенно эффективен, если олигомер и мономеры имеют существенно различное содержание отдельных аминокислот [29, 185].

Для олигомера из двух субъединиц α и β содержание любой из аминокислот рассчитывают по формуле:

$$X = aX_{\alpha} + bX_{\beta}$$

где X, X_{α} и X_{β} — содержание (в молярных процентах) аминокислоты в олигомере и субъединицах, a и b — коэффициенты, отражающие соотношение субъединиц α и β, по массе. Для определения коэффициентов a и b используют метод регрессионного анализа.

1.5. Сшивание олигомера и мономера

О факте сшивания отдельных субъединиц свидетельствуют данные анализа N-концевых аминокислотных остатков. Например, выход N-концевой аминокислоты в количестве >1 моль/моль белка может служить доказательством присутствия в олигомере двух идентичных полипептидных цепей. Аналогичным образом выход N-концевых аминокислот (исключая серин) на уровне 50% может служить признаком того, что N-концевая аминокислота одной из двух цепей блокирована. Поскольку выход N-концевой аминокислоты зависит от многих факторов, в истолковании полученных результатов следует избегать поспешных выводов.

В белках были найдены различные типы поперечных связей: дисульфидная, альдольная и альдиминная. Наиболее лабильные из них — S—S-связи, поэтому на практике чаще всего прибегают именно к расщеплению дисульфидных связей. Для разделения образующихся полипептидных цепей используют обычные методы, принятые при разделении мономеров (разд. 1.3.2).

1.5.1. Дисульфидные связи

Дисульфидные связи расщепляют путем окисления, восстановления, с помощью реакций нуклеофильного замещения (HSO_3^-, CN^-, BH_4^-, H^-) [40, 106] (см. также гл. 2). При окислении S—S-связей образуются два остатка цистеиновой кислоты [160]. Дополнительные сульфогруппы придают молекуле белка заметную гидрофильность, повышая его растворимость в воде, в особенности в области низких pH. Однако окисление дисульфидных связей сопровождается модификацией других аминокислот и частичным гидролизом лабильных пептидных связей. Поэтому для введения сульфогруппы предпочитают проводить восстановительное расщепление дисульфидных связей, а затем мягкое окисление SH-групп реагентами ряда сультонов (внутренних сложных эфиров сульфокислот) (см. разд. 1.5.1.2 и 2.2.2.3).

Обычно дисульфидные связи расщепляют восстановлением, а полноту реакции контролируют с помощью реактива Эллмана [69, 102]. После восстановления образующиеся SH-группы алкилируют с целью исключить окисление с образованием цистина. Алкилирующий агент выбирают в соответствии с поставленной дополнительной задачей, например можно стремиться придать белку более высокую растворимость в водном буфере, ввести дополнительные точки для гидролиза трипсином или ввести лабильную защитную группу в расчете на последующую регенерацию SH-групп. Иногда защита по SH-группам может оказаться излишней, поскольку белок с восстановленными S—S-связями может быть устойчив в уксусной кислоте на холоду при pH 3 [7].

1.5.1.1. Расщепление дисульфидов.

Окисление цистеина или дисульфидных связей в белках рекомендуется проводить с помощью надмуравьиной кислоты [78] (см. также разд. 2.2.3.1).

После проведения окисления определяют аминокислотный состав исследуемого белка, контролируя прежде всего содержание цистеиновой кислоты. Выход цистеиновой кислоты должен составлять $\geqslant 85\%$, а выход S,S-диоксида метионина (при наличии остатка метионина) не менее 95%; триптофан при окислении разрушается полностью. При наличии хлоридов может происходить модификация тирозина, поэтому перед анализом рекомендуется удалять из образца ионы хлора. Колонку с дауэксом 2 (100 меш) в ацетатной форме промывают 3 М ацетатом натрия до отсутствия в элюате ионов хлора (контроль — реакция с нитратом серебра). Затем через колонку пропускают раствор белка (0,1 г белка на 1 мл объема ионита)

и промывают небольшим объемом буфера. При этом следует учитывать возможность потери белка на колонке.

Восстановление S—S-связей проводят главным образом 2-меркаптоэтанолом. Однако при недостаточно высоком избытке 2-меркаптоэтанол образует смешанные дисульфиды, к тому же он обладает неприятным запахом. Удовлетворительными свойствами обладают дитиотреит и дитиоэритрит, которые при небольшом избытке обеспечивают полноту восстановления. В ряде работ дисульфидные связи восстанавливали трибутилфосфином [150—152] (более детально эти методы обсуждаются в разд. 2.2.1).

Дисульфидные связи, соединяющие две или более полипептидные цепи, обычно доступны действию растворителей или реагентов даже в отсутствие денатурирующих агентов, тогда как внутрицепочечные S—S-связи чаще всего бывают маскированы и недоступны. Это обстоятельство позволяет проводить избирательное восстановление «экспонированных» S—S-связей. Полное восстановление дисульфидов рекомендуют проводить в слабокислой среде в присутствии мочевины или гунидингидрохлорида. Ни один из денатурирующих агентов не свободен от недостатков. Например, примеси мочевины в образце генерируют цианат-ионы на стадии конденсации при деградации по Эдману, что может препятствовать секвенированию. Опыт применения гуанидин-HCl не столь поучителен, однако при использовании хорошо очищенного препарата проблем при секвенировании не наблюдалось.

При исследовании γ_G-иммуноглобулина был разработан метод восстановления межцепочечных S—S-связей при сохранении внутрицепочечных [53].

В полученных фрагментах определяют содержание SH-групп или же смесь фракционируют в присутствии восстанавливающих агентов или в кислой среде. Для удобства работы тиолсодержащие фрагменты переводят в более стабильные или более растворимые производные.

Наиболее изученным, но вместе с тем не свободным от недостатков способом защиты SH-групп является карбоксиметилирование [68]. Следует отметить, что, если стадию конверсии тиазолинонов в фенилтиогидантоины при секвенировании по Эдману проводить в недостаточно мягких условиях, наблюдаются значительные потери S-карбоксиметилцистеина [84]. Полезным приемом является алкилирование ^{14}C-иодоацетамидом, однако с успехом применяются и другие реагенты.

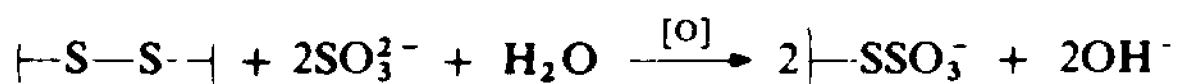
Если в дальнейшем планируется проводить исследование по ренатурации белка, можно получать производные с лабильными защитными группами. Некоторые из рекомендованных реагентов требуют осторожности в обращении. Например, иодоук-

сусная кислота — аллерген, и, как правило, с этим реактивом работают в резиновых перчатках при хорошей вентиляции (см. также гл. 2).

1.5.1.2. Обратимая модификация. При действии на цистин сульфита образуются цистеин и цистеинсульфонат (сульфоцистеин) (см. также разд. 2.2.4).

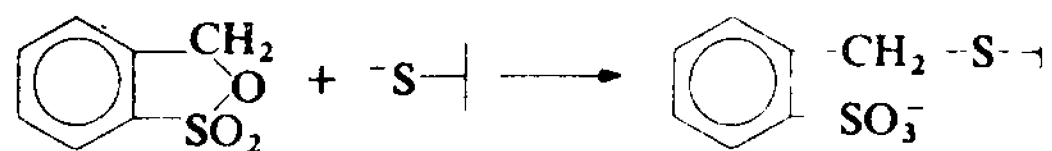


Дисульфидные связи можно реконструировать путем восстановления модифицированного белка и его ренатурации в присутствии кислорода воздуха. Окислительный сульфитолиз дисульфидов в присутствии солей меди приводит к образованию S-сульфонатов [37].



Аналогичные результаты были получены при реакции белка с сульфитом натрия в 8 М мочевине в присутствии кислорода воздуха и следов цистеина [31]. Восстановление цистина дитиотреитом и последующая обработка тетратионатом натрия приводит к образованию S-сульфоцистеина с количественным выходом [85]. S-сульфоцистеин устойчив при нейтральном pH и в условиях деградации по Эдману, однако при восстановлении образует цистеин. При гидролизе белков 6 М HCl S-сульфоцистеин превращается в цистин [37]. Серьезную проблему представляет контроль за полнотой реакции: при использовании [^{35}S]сульфита контроль ведут по включению метки [31].

При взаимодействии ω-толуолсультона с восстановленным белком при pH 8,3 образуется S-2-сульфобензилцистеин [153].



Обратную реакцию проводят путем восстановления натрием в жидком аммиаке; с целью воспрепятствовать расщеплению связей Тге-Pro в реакционную смесь добавляют амид натрия. Белки, модифицированные путем сульфитолиза и сульфобензилирования, хорошо ратворимы в воде.

Окислительный сульфитолиз [31]. Метод с успехом применялся при исследовании альдолазы, лектатдегидрогеназы и пепсиногена. Полнота реакции достигается только в диапазоне pH 7,0—8,5, что свидетельствует об участии

в реакции протонированной аминогруппы цистеина. Образец белка (2 мг/мл) инкубируют в присутствии кислорода воздуха при 25 °С в течение 1 ч в растворе следующего состава: 0,1 М трис-HCl (pH 8,4)+8 М мочевина (или 6 М гуанидин-HCl)+0,05 М сульфит натрия, 0,2 мМ цистеин. По завершении реакции реакционную смесь диализуют и высушивают лиофильно.

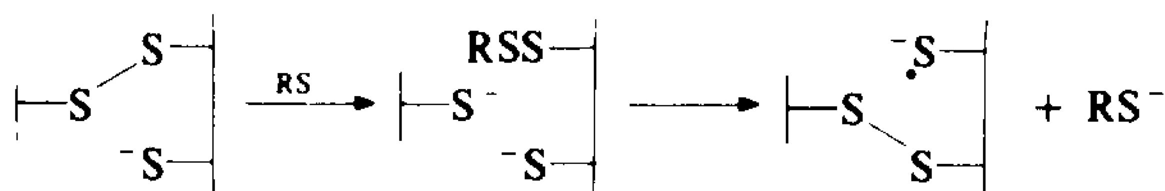
После сульфитолиза активный фермент (альзолазу) получают по следующей методике. Образец белка (0,5—1 мг/мл) растворяют в 0,1 М трис-HCl (pH 7,5), содержащем 4 М мочевину, добавляют 2-меркаптоэтанол (до концентрации 0,7 моль/л) и инкубируют при 25 °С в течение 2 ч. Затем реакционную смесь разбавляют в 10 раз буферным раствором следующего состава: 0,1 М трис-HCl (pH 7,5)+2,5 мг/мл бычий сывороточный альбумин+25 мМ ЭДТА+10 мМ 2-меркаптоэтанол; инкубируют в присутствии кислорода воздуха и спустя 15 мин определяют активность ренатурированного фермента.

S-Сульфобензилирование [153]. Образец белка (100 мкмоль) в 100 мл 0,5 М бикарбоната натрия в смеси с пропанолом (1 : 1) инкубируют в атмосфере азота с трибутилфосфином (330 мкмоль) и ω-толуолсультоном (204 мг, 1200 мкмоль). Избыток ω-толуолсультона отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают до остаточного объема 40 мл и диализуют против воды. На аминокислотном анализаторе S-сульфобензилцистеин элюируется непосредственно после цистеиновой кислоты. При проведении реакции с инсулином выход производных цистеина количественный.

Снятие S-сульфобензильной группы [90]. 300 мг белка тщательно высушивают, растворяют в безводном жидком аммиаке (300 мл) в круглодонной колбе при охлаждении сухим льдом в ацетоне. Для защиты лабильных пептидных связей остатка пролина в реакционную смесь добавляют ~120 мг амида натрия. Последующие стадии проводят при температуре кипения жидкого аммиака. Предварительно приготовленный раствор металлического натрия в жидком аммиаке добавляют по каплям до тех пор, пока реакционная смесь не приобретает слабую голубую окраску. Выдерживают 30 с и добавляют несколько капель (2—3) ледяной уксусной кислоты до исчезновения окраски, затем аммиак упаривают до остаточного объема 10 мл. Остаток упаривают в вакууме на роторном испарителе и высушивают досуха на водоструйном насосе.

1.5.1.3. Окисление. Реконструкция большинства дисульфидных связей в некоторых белках достигается при окислении кислородом воздуха, т. е. при аэрировании раствора восстановленного белка [70]. По-видимому, молекуле нативного белка свойственна термодинамически наиболее выгодная конформация, и, следовательно, главным фактором, способствующим «правильному» сближению тиольных групп, является кооперативное (согласованнное) взаимодействие функциональных групп полипептидной цепи. Если распределение дисульфидных связей в белке определяется главным образом конформацией белка-предшественника (например, в случае инсулина проинсулином), то такие белки ренатурируют с трудом. Далее приводится общепринятая методика окисления белков с целью ренатурации, однако оптимальные условия реакции определяются в зависимости от индивидуальных свойств исследуемого белка, его первичной структуры и трехмерной укладки полипептидной цепи. Например, добавление 2-меркаптоэтанола и увеличение температуры до 38 °С оказались полезными при ренатурации

лизоцима, но неэффективными в случае рибонуклеазы [56]. В случае других белков оптимальную концентрацию 2-меркаптоэтанола подбирают эмпирическим путем. Оба фактора — низкая концентрация белка и присутствие 2-меркаптоэтанола — препятствуют агрегации субъединиц и образованию межмолекулярных дисульфидных связей. Предполагают, что 2-меркаптоэтанол катализирует дисульфидный обмен, необходимый для коррекции неправильно замкнутых остатков цистеина.



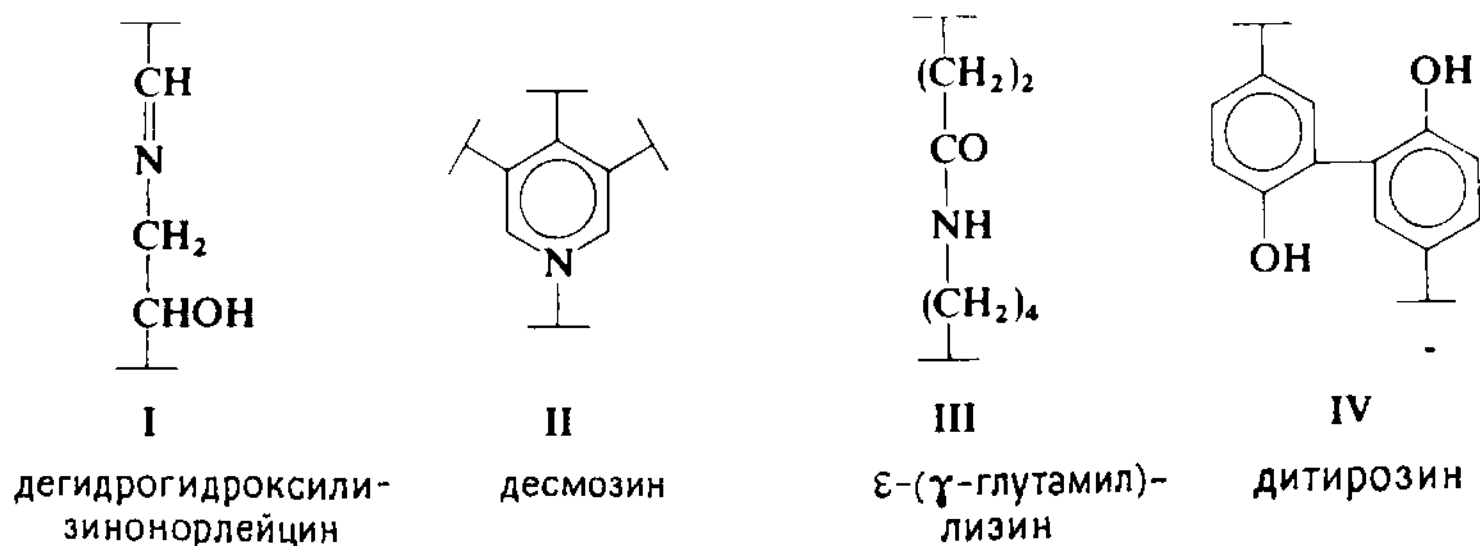
Ионы металлов из-за связывания с тиолами ингибируют активацию. При активации используют медленный диализ денатурирующих агентов, например мочевины. Для доступа кислорода вполне достаточно проводить реакцию в открытых сосудах; активная аэрация не рекомендуется, так как может вызвать денатурацию белка.

Методика 1 [56]. Ренатурацию восстановленного лизоцима (0,025 мг/мл) проводят в 0,1 М трис-буфере (pH 8,5) при 38 °С в течение 2 ч в присутствии 2-меркаптоэтанола (при молярном отношении 2-меркаптоэтанол : цистеин = =180 : 1). Выход активированного продукта 70%.

Методика 2 [52]. Восстановленные цепи инсулина (5 мг белка/мл) осаждают при pH 3,8 и тщательно промывают деаэрированным буфером на холоду. Окисление кислородом воздуха проводят в глициновом буфере (pH 10,6) при 35 °С. Ренатурированный белок имеет 50%-ную активность по сравнению с кристаллическим препаратом. Активность полученного гормона зависит от относительного содержания в реакционной смеси полипептидных цепей; максимальный выход достигается при соотношении A : B = 1,5 : 1.

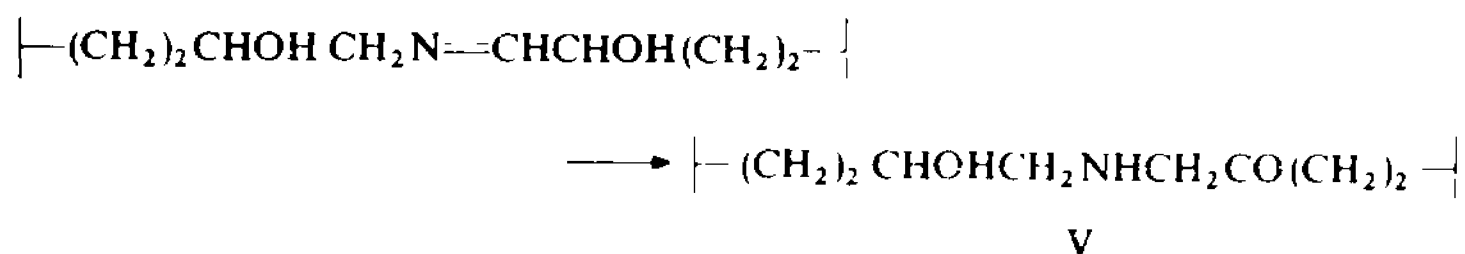
1.5.2. Другие типы поперечных связей в белках

В белках встречаются иные типы межмолекулярных связей, с трудом поддающиеся анализу и специфическому расщеплению. Это альдиминная связь (I) в коллагене [172], десмозин (II) и изодесмозин в эластине (могут связывать 4 полипептид-



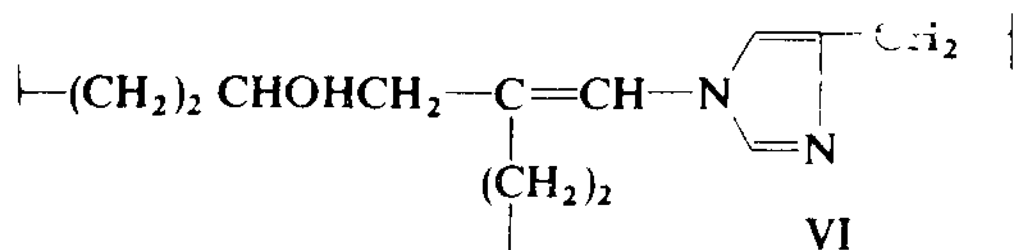
ные цепи) [67], изопептидные связи между ε-аминогруппой лизина и амидной группой глутамина (III) в экстрацеллюлярных структурных белках [10, 117] и, по-видимому, ди- (IV) и тритирозины [109].

1.5.2.1. Альдимины. На первой стадии образования межмолекулярных связей в коллагенах происходит окислительное дезаминирование N- и С-концевых остатков лизина и гидроксилизина под действием фермента лизилоксидазы, представляющего собой медьсодержащий металлопротеин. Образующиеся альдегиды аллизин $(CH_2)_3CHO$ и гидроксиаллизин ⊢$(CH_2CHOHCH_2CHO)$ вступают в реакцию конденсации в



основном с ε-аминогруппами гидроксилизина с образованием дегидрогидроксилизинлнорлейцина (I) или дегидродигидроксилизилнорлейцина. Альдимины восстанавливаются по двойным связям с помощью борогидрида калия, в результате чего поперечная связь приобретает устойчивость к кислотному гидролизу. Однако дигидроксипроизводное лабильно и перегруппировывается в кетоимин гидроксилизил-5-кетонорлейцин (V) [103]. После щелочного гидролиза коллагена, восстановленного борогидридом, выделены и охарактеризованы галактозил- и глюкогалактозилпроизводные этих фрагментов [145].

Обычно с целью идентификации альдиминный фрагмент коллагена вначале стабилизируют путем восстановления (главным образом цианоборогидридом натрия) [147], затем проводят ферментативный гидролиз и выделяют сшитые между собой пептиды. Эти фрагменты несложно идентифицировать, если использовать восстанавливающий агент, содержащий тритиевую метку. После восстановления и кислотного гидролиза коллагенов (из разных тканей) были выделены и идентифицированы

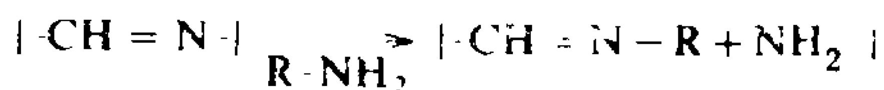


ны гидроксилизилнорлейцин, дигидроксилизилнорлейцин, гидроксимеродесмозин, гидроксиальдольгистидин и гистидилгидроксимеродесмозин [172]. Кроме того, был получен и иден-

тифицирован гидроксиальдольгистидин (IV) (образующийся из аллизина, гидроксиаллизина и гистидина), который не восстанавливается борогидридом, но устойчив к кислотному гидролизу [81].

Однако еще не решен вопрос, соответствуют ли эти соединения (и ряд других) фрагментам с поперечными связями в нативных белках (и если да, то насколько) или это артефакты и каким образом альдимины превращаются в устойчивые к восстановлению фрагменты в процессе старения организма [103].

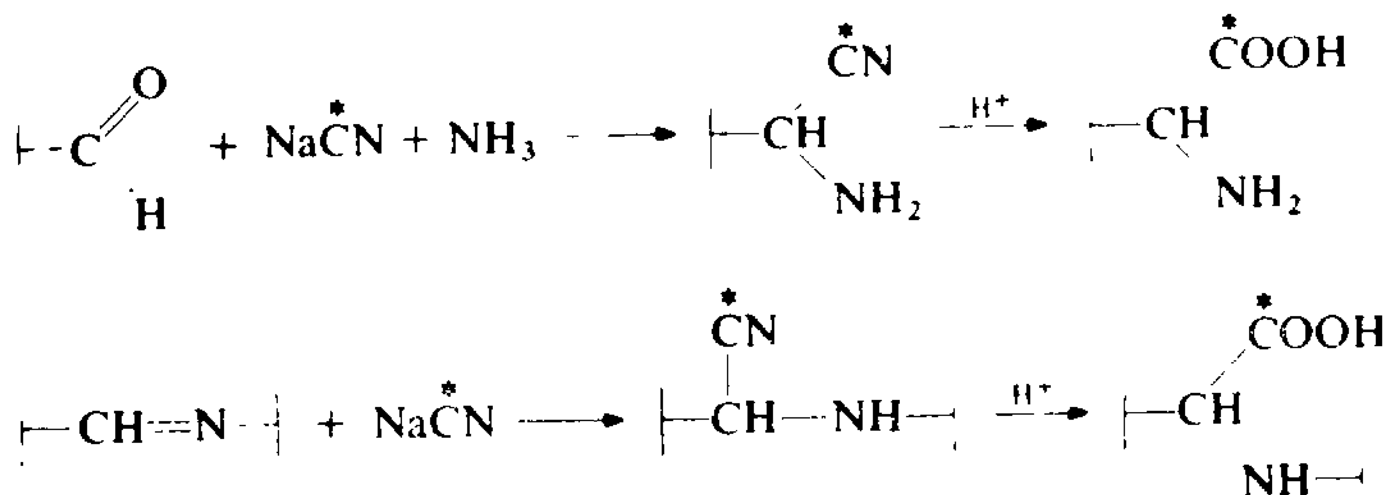
Расщепление альдимина [58]. В желатине поперечные связи расщепляются под действием β-аминопропионитрила. β-Аминопропионитрил нейтрализуют ледяной уксусной кислотой, добавляют буферный раствор, желатину, с помощью уксусной кислоты устанавливают pH 7,6 (в реакционной смеси



содержится желатины 1—2 мг/мл, β-аминопропионитрила 1,9 моль/л, уксусной кислоты 1,3 моль/л, трис 1,6 ммоль/л, $MgCl_2$ 0,8 ммоль/л), добавляют несколько капель толуола, пробирку закрывают и смесь инкубируют при 38 °C в течение 48 ч.

Восстановление цианоборогидридом натрия [74]. Образец диализуют против 0,1 *М* натрий фосфатного буфера (pH 4,4) в течение 4 ч, добавляют цианоборогидрид натрия (белок : $NaBH_3CN$=30 : 1, по массе) и реакционную смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем диализуют и высушивают лиофильно.

Восстановление [^{14}C]цианидом натрия в аммиаке [130]. Этот метод специально разработан для идентификации поперечных связей в фибриллярных белках, поскольку в случае фибрина реакция восстановления борогидридом натрия (при pH 8) идет с низким выходом и плохо воспроизводима. Продукт реакции — аминонитрил или производное аминокислоты, отражающее строе-

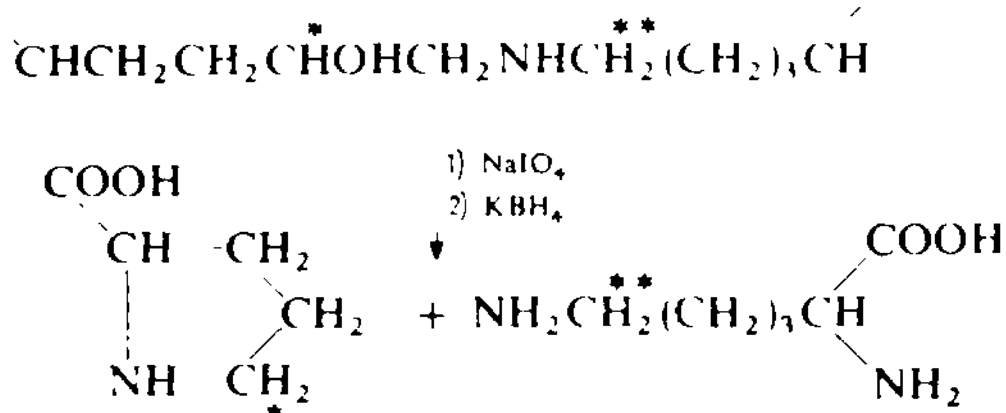


ние альдимина. Продукты реакции устойчивы к кислотному гидролизу, легко отделяются от аминокислот и хорошо идентифицируются на аминокислотном анализаторе.

Тонко измельченный эластин (10 мг) суспендируют в воде (2 мл), добавляют 2 мг [^{14}C]цианида натрия (удельная активность 1,1 мКи/мкмоль) и 2 мл 30%-ного аммиака. Затем реакционную смесь (pH 11,5) инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч, подкисляют до pH 1 и диализуют

против 0,1 *M* HCl при 4 °С. При модификации альдиминов присутствие аммиака не обязательно. Если вместо аммиака использовать меченный тритием метиламин, полученный альдегид будет содержать двойную метку. Поскольку удельная активность $Na^{14}CN$ известна, выход можно оценить количественно. Этот метод введения радиоактивной метки неприменим в случае пиридиниевой формы десмозинов.

Расщепление поперечных связей периодатным методом [146]. После восстановления поперечные связи коллагена можно расщепить путем окисления периодатом при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем с помощью борогидрида калия разрушают избыток периодата, а продукты окисления восстанавливают до пролина и лизина, которые идентифицируют на аминокислотном анализаторе. Если восстанавливающий агент KBH_4 содержит тритиевую метку ^3H, радиоактивная метка распределяется в соответствии с уравнением реакции:



К восстановленному белку в 1 мл цитратного буфера (pH 5,3) добавляют 0,01 *M* $NaIO_4$ и выдерживают в темноте при комнатной температуре. Спустя 5 мин в реакционной смеси устанавливают с помощью 2 *M* NaOH pH 7,5 и добавляют KBH_4 (2—5 мг). Инкубируют в течение 30 мин, а затем добавляют 6 *M* HCl до pH 2.

Выделение пептидов, соединенных поперечными связями [169]. Для выделения пептидов, соединенных поперечными связями, с успехом используют хроматографию на гидроксиапатите. По-видимому, пептиды, сшитые поперечными связями, сохраняют конформацию нативного белка и благодаря этому проявляют большее сродство к гидроксиапатиту. Нативный или восстановленный нерастворимый коллаген (из кожи или костей быка) расщепляют бромоцианом, смесь пептидов растворяют и дополнительно диализуют против стартового буфера (0,001 *M* Na_2HPO_4, pH 6,8+1 *M* мочевина+ 0,15 *M* NaCl) и затем наносят на колонку (1,5×23 см) с гидроксиапатитом (Hypatite C). Проводят элюирование в линейном градиенте фосфатного буфера (в смеситель помещают 450 мл стартового 0,001 *M* фосфатного буфера; в резервуар 450 мл 0,2 *M* Na_2HPO_4, pH 6,8, содержащего 1 *M* мочевины 0,15 *M* NaCl). После сбора 800 мл элюата элюирование продолжают в экспоненциальном градиенте. Для этого смеситель герметически соединяют с делительной воронкой, содержащей 450 мл более концентрированного буфера (0,8 *M* Na_2HPO_4, pH 6,8+1 *M* мочевина+0,15 *M* NaCl). Элюат собирают по фракциям (объем 5,5 мл), скорость элюирования 60 мл/ч. Фракции, содержащие сшитые пептиды, объединяют, обессоливают диализом против воды и высушивают лиофильно. При восстановлении с помощью NaB^3H_4 гидролизата коллагена из костей быка были получены две главные и одна минорная фракции. Материал второй главной фракции имел максимальную молекулярную массу, характеризовался высокой степенью спирализации и действительно содержал сшитые пептиды.

1.5.2.2. Десмозины. Для идентификации десмозина эластин восстанавливают $NaBD_4$ в воде или D_2O, аминокислоты разделяют

хроматографически или переводят в N-трифтороацетилметиловые эфиры и анализируют масс-спектрометрически [129].

1.5.2.3. Изопептиды. Наиболее известным изопептидным фрагментом, связывающим полипептидные цепи в белках, является N^{ε}-(γ-глутамил)лизин [107, 117]. После полного ферментативного гидролиза белка или смеси пептидов этот фрагмент можно идентифицировать с помощью аминокислотного анализа. На кривой элюирования ему соответствует пик в области изолейцина. Однако полное разрешение достигается лишь в особых условиях, например в буфере с pH 4,8. Относительно возможной роли N^{ε}-(β-аспартил)лизина как сшивающего фрагмента см. работу [92].

1.6. Получение мономеров с целью секвенирования

В идеальном случае при секвенировании по Эдману хорошо подготовленных образцов выход N-концевой аминокислоты должен быть количественным. Иными словами, образцы не должны содержать солей, каких-либо примесей, а N-концевая аминокислота должна быть свободна от защитных групп. В процессе очистки следует исключить возможность модификации функциональных групп аминокислот, поскольку автоматическое секвенирование возможно при условии максимального выхода на каждом цикле. Меры предосторожности, исключающие блокирование N-концевых аминокислот и образование гетерогенных препаратов, вкратце обсуждались в предыдущих разделах. В этот раздел включены специальные методики подготовки белков к анализу, в том числе способы делипидизации и отщепления олигосахаридных цепей у гликопротеинов с высоким содержанием углеводов.

1.6.1. Гидролиз N-концевой пироглутаминовой кислоты

Создание эффективного метода отщепления остатка пироглутаминовой кислоты решило проблему секвенирования белков, блокированных вследствие циклизации N-концевых Gln и Glu [136]. Поскольку благодаря «реакции деблокирования», протекающей с высоким выходом, становится доступной α-аминогруппа последующего аминокислотного остатка, реакцию циклизации следует рассматривать как удобный способ создания защитной группы на стадиях очистки белка. Снятие защиты осуществляют путем двукратной инкубации с пироглутаматаминопептидазой печени крупного рогатого скота. Метод был впервые использован при анализе легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, а затем при анализе тяжелой цепи гемагглютинина вируса гриппа [181].

1.6.1.1. Отщепление N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты [136]. Пироглутамат-аминопептидазу печени крупного рогатого скота (L-пироглутамилпептид — гидролаза, КФ 3.4.11.8) хранят в лиофильно-высушенном состоянии при —20 °С. Раствор (10 мл, 1 мг/мл) восстановленного и алкилированного белка диализуют при 4 °С против 0,1 *М* фосфатного буфера (рН 8), содержащего 5 м*М* ДТТ+10 м*М* ЭДТА+5%-ный (об.) глицерин. Затем препарат переносят в реакционную ампулу с герметически закрывающейся крышкой, добавляют 0,025 мг фермента, продувают азотом, плотно закрывают, перемешивают. Инкубацию проводят при 4 °С в течение 9 ч при периодическом перемешивании. Добавляют вторую порцию фермента (0,025 мг) и вновь инкубируют в атмосфере азота при 20 °С в течение 14 ч. Реакционную смесь диализуют против 0,05 *М* уксусной кислоты, высушивают лиофильно, образец белка секвенируют в автоматическом режиме.

Разработан метод гидролиза пироглутаминовой кислоты с образованием N^{γ}-метилглутамина [125]. Защищенный пептид инкубируют в 17%-ном растворе метиламина при 37 °С в течение 14 ч (или более). После дансилирования и последующего гидролиза идентифицируют ДНС-глутаминовую кислоту.

1.6.2. Восстановление сульфоксидов N-метилмеркаптоацетамидом

По результатам аминокислотного анализа трудно оценить степень окисления остатков метионина на стадии подготовки белковых препаратов хотя бы потому, что в процессе гидролиза может идти обратная реакция частичного восстановления [156]. Однако о потерях метионина можно судить по низкому выходу при расщеплении бромцианом [66]. Низкий выход цистина также может быть обусловлен образованием сульфоксида цистеина [85] или алкилцистеина [86]. Частичное окисление существенно затрудняет идентификацию соответствующих ФТГ-аминокислот при глубоком секвенировании. Из множества других реагентов N-метилмеркаптоацетамид наиболее эффективен как восстановитель S-оксида метионина [80]. Реакцию метионин-S-оксида (1 мг/мл) с 0,7—2,8 *М* N-метилмеркаптоацетамидом проводят при рН 2,6—8,5 и 37 °С в течение 12—14 ч в атмосфере азота.

Восстановление сульфоксида S-карбоксиметилцистеина в пептидах и белках проводят в те же условиях, однако время реакции увеличивают в 5 раз.

При окислении белка надмуравьиной кислотой метионин превращается в стабильный S,S-диоксид. Перед стадией окисления [87] остаток триптофана переводят в оксиндолил-3-ала-

нин [155] или кинуренин [11], более стабильные в условиях деградации по Эдману. Метод, предложенный в работе [155], более специфичен (разд. 2.5.3). При превращении триптофана побочной реакцией является образование метионин-S-оксида, который может быть избирательно восстановлен в метионин [156].

1.6.3. Техника работы с липопротеинами

Апопротеины обычно готовят из липопротеинов путем экстракции липидов органическими растворителями (этанолом, смесями эфир — этанол, метанол — хлороформ), однако некоторые апопротеины частично растворимы в органических растворителях. Сывороточные липопротеины содержат фракцию низкомолекулярных пептидов, растворимых в этаноле и в меньшей степени в смеси этанол — эфир, тогда как высокомолекулярные липопротеины нерастворимы в органических растворителях [157]. Растворимость апопротеинов в органических растворителях уменьшается при понижении температуры. Имеются данные, что некоторые мембранные белки включают ковалентно связанные липиды [159].

1.6.3.1. Методики.

Экстракция липопротеинов низкой плотности [157]. Экстракцию проводят при —10 °С. Раствор белка (2—5 мг/мл) диализуют против 0,15 *М* NaCl, содержащего 1 м*М* ЭДТА, а затем по каплям прибавляют к 50 мл смеси эфир — 95%-ный этанол (1 : 3) в круглодонной центрифужной пробирке на 50 мл. Экстракцию проводят в течение 2 ч при медленном вращении пробирки (15 об./мин). В заключение осадок отделяют центрифугированием при 2000 об./мин в течение 10 мин. Повторную экстракцию проводят аналогичным образом. В заключение осадок трижды промывают эфиром и высушивают в атмосфере азота. Для регенерации белка, частично перешедшего в органический растворитель, первый экстракт разбавляют эфиром (до соотношения этанол : эфир=3 : 5) и выдерживают при —10 °С в течение 12 ч.

Экстракция липопротеинов желтка куриного яйца [30]. Раствор липопротеина в 1 *М* NaCl (~6% масс./об.) диализуют несколько раз против 6 *М* мочевины+0,05 *М* HCl (pH 3,3) при 20 °С до почти исчерпывающего удаления NaCl. С целью ускорения обессоливания можно провести предварительный диализ против дистиллированной воды. К полученному раствору (17 мл) добавляют смесь хлороформ — метанол (20 мл+40 мл) и гомогенный раствор инкубируют при 20—25 °С в течение 30 мин, после чего добавляют 20 мл хлороформа. Нижний слой отбрасывают, верхний слой вторично экстрагируют 10 мл хлороформа. В случае необходимости эмульсию центрифугируют. Слой хлороформа отбрасывают, водный слой выдерживают при 20 °С в течение 20 ч, а затем диализуют против 6 *М* мочевины.

1.6.4. Отщепление олигосахаридных фрагментов гликопротеинов

Для отщепления олигосахаридных фрагментов гликопротеинов можно использовать продажный раствор HF в пиридине (реакцию проводят при комнатной температуре в течение 90 мин).

Однако этот реагент не всегда действует столь эффективно, как безводный HF, который расщепляет гликозидные связи нейтральных и кислых сахаров при 0 °С в течение 1 ч [124]. К сожалению, при такой обработке изменяются физические свойства белка, хотя образец может быть вполне пригоден для секвенирования.

1.6.4.1. Методика [124]. Реакцию с безводным фтороводородом проводят в специальной аппаратуре, например поставляемой фирмой Peninsula Lab. Inc. Тщательно высушенный образец гликопротеина (до 100 мг) и безводный метанол (до 10% от объема образца) помещают в реактор. Линию подачи HF вакуумируют, за исключением баллона с жидким HF. Реактор охлаждают сухим льдом в ацетоне и перегоняют в него 10 мл жидкого HF (в качестве поглотителя влаги в жидком HF используют трифторид кобальта). Перегонку проводят при осторожном вращении обоих сосудов. Реактор нагревают естественным путем до подходящей температуры (давление паров HF при 0 °С 364 мм рт. ст. и при 23 °С 850 мм рт. ст.) и с этого момента отсчитывают время начала реакции. Если реакцию проводят при 0 °С, реактор охлаждают в ледяной бане. В заключение реактор эвакуируют через ловушку с CaO. С целью предотвращения вспенивания реакционной смеси вакуум следует набирать постепенно, но достаточно энергично, чтобы быстро отогнать HF, не допуская олигомеризации. После упаривания HF линию выдерживают под вакуумом еще в течение 1 ч. О полноте удаления HF судят по переходу окраски реакционной смеси от светло-коричневой и красноватой в бесцветную. Затем образец растворяют в 0,1 М или 50%-ной уксусной кислоте и немедленно хроматографируют на колонке с сефадексом или диализуют.

При более жесткой обработке безводным HF (23 °С, 3 ч) идет расщепление O-гликозидных связей аминосахаров, однако пептидные и N-гликозидные связи не затрагиваются.

1.6.5. Обессоливание

Обычно мономер или полипептидные цепи обессоливают с помощью диализа или гель-фильтрации. Значение операции обессоливания не следует недооценивать. Иногда, прежде чем вести диализ против воды, образец целесообразно диализовать против разбавленных электролитов или буферных растворов. В этом случае образец сохранит растворимость в воде после исчерпывающего обессоливания. Для диализа в небольшом объеме выпускаются специальные ячейки.

Гель-фильтрация на заранее подготовленных колонках (разд. 1.2.2.1) — более быстрый способ обессоливания. Элюент и параметры матрицы выбирают в соответствии с растворимостью и молекулярной массой исследуемого белка. Слаборастворимые гидрофобные белки растворяют в 98%-ной муравьиной кислоте, которую перед нанесением образца на колонку разбавляют до 75%-ной концентрации (разд. 1.3.2.1). Белки с молекулярной массой 5000—30 000 обессоливают на сефадексе G-25, более высокомолекулярные белки — на сефадексе G-50. Объем образца не должен превышать 1/3—1/4 объема колонки. Фирма Pharmacia выпускает колонки с сефадексом G-25, рассчи-

танные на быстрое (в течение 5 мин) обессоливание образцов объемом 2,5 мл.

1.6.5.1. Проведение обессоливания [83]. Небольшие пептиды обессоливают на колонках с биогелем Р-2 в 1 *М* уксусной кислоте или с сефадексом G-10 в 1 *М* NH_4OH, а затем высушивают лиофильно.

Крупные пептиды и белки трижды диализуют в течение 12 ч против 0,15 М NaCl, содержащего 0,1% ДСН, а затем трижды против 0,02% ДСН. Если белок был выделен методом электрофореза в ПААГ — ДСН, элюат центрифугируют при 20 000 об./мин в течение 20 мин для удаления частиц акриламидного геля. Примеси красителя кумасси не мешают секвенированию. Однако следует помнить, что равновесное распределение ДСН через диализную мембрану — процесс медленный и может потребовать нескольких дней. Таким образом, окончательная концентрация ДСН в образце зависит от продолжительности диализа.

Для обессоливания образцов можно использовать электродиализ (разд. 17.3.1).

Литература

1. *Ackers G. K.*, In: The Proteins, I, 3rd edn., Neurath H., Hill R. L. (Eds.), Academic Press, New York, 1975, pp. 2—94.
2. *Ahmadi B.*, Anal. Biochem., **97**, 229—231 (1979).
3. *Allen R. C., Maurer H. R.* (Eds.), Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gels, Walter de Gruyter, Berlin, 1974.
4. *Amos L. A.*, In: Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry, B, 111, Elsevier/North-Holland, Shannon, 1978, pp. 1—26.
5. *Andersson L. O., Borg H., Mikaelsson M.*, FEBS Lett., **20**, 199—202 (1972).
6. *Andrews P.*, Biochem. J., **91**, 222—233 (1964).
7. *Anfinsen C. B., Haber E.*, J. Biol. Chem., **236**, 1361—1363 (1961).
8. *Ansari A. A., Mage R. G.*, J Chromatogr., **140**, 98—102 (1977).
9. *Aoshima H.*, Anal. Biochem., **95**, 371—376 (1979).
10. *Asquith R. S., Otterburn M. S., Sinclair W. J.*, Angew. Chem. Int. Edn., **13**, 514—520 (1974).
11. *Atassi M. Z.*, Arch. Biochem. Biophys., **120**, 56—59 (1967).
12. *Axelsson I.*, J. Chromatogr., **152**, 21—32.
13. *Baker T. S., Eisenberg D., Eiserling F. A., Weissman L.*, J. Mol. Biol., **91**, 391—399 (1975).
14. *Ballou B., McKean D. J., Freedlender E. F., Smithies O.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**, 4487—4491 (1976).
15. *Banks B. E. C., Doonan S., Flogel M., Porter P. B., Vernon C. A., Walker J. M., Crouch T. H., Halsey J. F., Chiancone E., Fasella P.*, Eur. J. Biochem., **71**, 469—473 (1976).
16. *Bates D. L., Harrison R. A., Perham R. N.*, FEBS Letts., **60**, 427—430 (1975).
17. *Bates D. L., Perham R. N., Coggins J. R.*, Anal. Biochem., **68**, 175—184 (1975).
18. *Belew M., Fohlman J., Janson J.-C.*, FEBS Letts., **91**, 302—304 (1978).
19. *Belew M., Porath J., Fohlman J., Janson J.-C.*, J. Chromatogr., **147**, 205—212 (1978).
20. *Bijlholt M. M. C., Van Bruggen E. F. J., Bonaventura J.*, Eur. J. Biochem., **95**, 399—405 (1979).
21. *Birdi K. S.*, Anal. Biochem., **74**, 620—622 (1976).
22. *Bock R. M., Ling N.-S.*, Anal. Chem., **26**, 1543—1546 (1954).
23. *Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A., Peterson S., Peterson U.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **352**, 1730—1732 (1971).

24. *Broadmeadow A. C. C., Wilce P. A.*, Anal. Biochem., **100**, 87—91 (1979).
25 *Brouwer J.*, J. Chromatogr., **179**, 342—345 (1979).
26. *Brown W. E., Howard G. C.*, Anal. Biochem., **101**, 294—298 (1980).
27. *Bull H. B., Breese K.*, Arch. Biochem. Biophys., **202**, 116—120 (1980).
28. *Bull H. B., Breese K., Ferguson G. L., Swenson C. A.*, Arch. Biochem. Biophys., **104**, 297—304 (1964).
28. *Burgess R. R.*, J. Biol. Chem., **244**, 6168—6176 (1969).
30. *Burley R. W.*, Biochemistry, **12**, 1464—1470 (1973).
31. *Chan W. W.-C.*, Biochemistry, 7, 4247—4253 (1968).
32. *Chantler P. D., Gratzer W. B.*, Anal. Biochem., **91**, 626—635 (1978).
33. *Chrambach A.*, Molec. Cellular Biochem., **29**, 23—46 (1980).
34. *Chrambach A., Rodbard D.*, Science, **172**, 440—451 (1971).
35. *Chrambach A., Jovin T. M., Svendsen P. J., Rodbard D.*, In: Methods of Protein Separation, vol. 2, Catsimpoolas N. (Ed.), Plenum Press, New York, London, 1976, pp. 27—144.
36. *Cohn E. J., Edsall J. T.*, In: Proteins, Amino Acids and Peptides, Reinhold, New York, 1943, p. 602.
37. *Cole R. D.*, Methods Enzymol., **11**, 206—208 (1967).
38. *Cole E. G., Mecham D. K.*, Anal. Biochem., **14**, 215—222 (1966).
39. *Cook R. A., Koshland D. E.*, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A, **68**, 247—254 (1969).
40. *Crewther W. G.*, Proc. 5th Wool Text. Res. Conf. Aachen, 1975, **1**, 1—101 (1976).
41. *Crewther W. G., Inglis A. S., McKern N. M.*, Biochem. J., **173**, 365—371 (1978).
42. *Crewther W. G., Dowling L. M., Gough K. H., Marshall R. G., Sparrow L. G.*, In: Fibrous Proteins: Scientific, Industrial and Medical Aspects, vol. 2, Parry D. A. D., Creamer L. K. (Eds.), Academic Press, London, 1980, pp. 151—159.
43. *Davis B. J.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404—427 (1964).
44. *Davies G. E., Stark G. R.*, Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A., **66**, 651—656 (1970).
45. *De Abreu R. A., De Vries J., De Kok A., Veeger C.*, Eur. J. Biochem., **97**, 379—387 (1979).
46. *De Jong W. W., Zweers A., Cohen L. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **82**, 532—539 (1978).
47. *Dirnhuber P., Schutz F.*, Biochem. J., **42**, 628—632 (1948).
48. *Dixon M.*, Biochem. J., **54**, 457—458 (1953).
49. *Djondjurov L., Holtzer H.*, Anal. Biochem., **94**, 274—277 (1979).
50. *Dohnal J. C., Garvin J. E.*, Biochim. Biophys. Acta, **576**, 393—403 (1979).
51. *Dowling L. M., Crewther W. G.*, Preparative Biochemistry, 4, 203—226 (1974).
52. *Du Y. C., Jiang R. Q., Tsou C. L.*, Sci. Sin., **14**, 229—236 (1965).
53. *Edelman G. M., Gall W. E., Waxdal M. J., Konigsberg W. H.*, Biochemistry, 7, 1950—1958 (1968).
54. *Edman P., Begg G.*, Eur. J. Biochem., 1, 80—91 (1967).
55. *Edman P., Henschen A.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), 2nd edn., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975, pp. 232—279.
56. *Epstein C. J., Goldberger R. F.*, J. Biol. Chem., **238**, 1380—1383 (1963).
57. *Ferguson K. A.*, Metabolism, 13, 985—1002 (1964).
58. *Fessler J. H., Bailey A. J.*, Biochim. Biophys. Acta, **117**, 368—378 (1966).
59. *Fischer L.*, In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 1, part II, Work T. S., Burdon R. H. (Ed.), 2nd edn., North-Holland, Amsterdam, 1980, pp. 157—396.
60. *Fish W. W., Mann K. G., Tanford C.*, J. Biol. Chem., **244**, 4989—4994 (1969).

61. *Fishbein W. N.*, Anal. Biochem., **46**, 388—401 (1972).
62. *Frieden C., Nicol L. W.* (Eds.), Protein-Protein Interactions, Wiley, New York, 1981.
63. *Gianazza E., Righetti P. G.*, J. Chromatogr., **193**, 1—8 (1980).
64. *Gibson D. R., Gracy R. W.*, Anal. Biochem., **96**, 352—354 (1979).
65. *Gillespie J. M., Frenkel M. J.*, Aust. J. Biol. Sci., **27**, 617—627 (1974).
66. *Gross E.*, Methods Enzymol., **11**, 238—255 (1967).
67. *Guay M., Lamy F.*, Trends Biochem. Sci., 160—164 (1979).
68. *Gurd F. R. N.*, Methods Enzymol., **25**, 424—438 (1972).
69. *Habeeb A. F. S. A.*, Methods Enzymol., **25**, 457—464 (1972).
70. *Haber E., Anfinsen C. B.*, J. Biol. Chem., **237**, 1839—1844 (1962).
71. *Hagel P., Gerding J. J. T., Fieggen W., Bloemendal H.*, Biochim. Biophys. Acta, **243**, 366—373 (1971).
72. *Hajdu J., Bartha F., Friedrich P.*, Eur. J. Biochem., **68**, 373—383 (1976).
73. *Hames B. D., Rickwood D.* (Eds.), Gel Electrophoresis of Proteins, IRL Press, London, 1981.
74. *Henkel W., Rauterberg J., Glanville R. W.*, Eur. J. Biochem., **96**, 249—256 (1979).
75. *Henschen-Edman A.*, In: Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Second Internat. Conf., Previero A., Coletti-Previero M.-A. (Eds.), North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1977, pp. 7—18.
76. *Higgins R. C., Dahmus M. E.*, Anal. Biochem., **93**, 257—260 (1979).
77. *Hill M., Bechet J., d'Albis A.*, FEBS Letts., **102**, 282—286 (1979).
78. *Hirs C. H. W.*, Methods Enzymol., **11**, 197—199 (1967).
79. *Hofmeister F.*, Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol., **24**, 247—260 (1888).
80. *Houghten R. A., Li C. H.*, Anal. Biochem., **98**, 36—46 (1979).
81. *Housley T. J., Tanzer M. L., Henson E., Gallop P. M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **67**, 824—830 (1975).
82. *Hucho F., Mullner H., Sund H.*, Eur. J. Biochem., **59**, 79—87 (1975).
83. *Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Science, **207**, 523—525 (1980).
84. *Inglis A. S.*, J. Chromatogr., **123**, 482—485 (1976).
85. *Inglis A. S., Liu T. Y.*, J. Biol. Chem., **245**, 112—116 (1970).
86. *Inglis A. S., McMahon D. T. W., Roxburgh C. M., Takayanagi H.*, Anal. Biochem., **72**, 86—94 (1976).
87. *Inglis A. S., Rivett D. E., McMahon D. T. W.*, FEBS Lett., **104**, 115—118 (1979).
88. *Jeffrey P. D.*, In: Protein-Protein Interactions, Frieden C., Nicol L. W. (Eds.), Wiley, New York, 1981, pp. 213—257.
89. *Johansson I., Lundgren H.*, J. Biomed. Biophys, Methods, **1**, 37—44 (1979).
90. *Katsoyannis P. G., Schwartz G. P.*, Methods Enzymol., **47**, 501—578 (1977).
91. *Kirschner K., Bisswanger H.*, Ann. Rev. Biochem., **45**, 143—166, (1976).
92. *Klostermeyer H.*, Methods Enzymol., **107**, 258—261 (1984).
93. *Klotz I. M., Darnall D. W., Langerman N. R.*, In: The Proteins, I, 3rd edn., Neurath H., Hill R. L. (Eds.), Academic Press, New York, 1975, pp. 293—411.
94. *Kubota I., Tsugita A.*, Eur. J. Biochem., **106**, 263—268 (1980).
95. *Laemmli U. K.*, Nature (Lond.), **227**, 680—685 (1970).
96. *Lakshmanan T. K., Lieberman S.*, Arch. Biochem. Biophys., **53**, 258—281 (1954).
97. *Lambin P.*, Anal. Biochem., **85**, 114—125 (1978).
98. *Lambin P., Fine J. M.*, Anal. Biochem., **98**, 160—168 (1979).
99. *Lambin P., Rochu D., Fine J. M.*, Anal. Biochem., **74**, 567—575 (1976).
100. *Landon M.*, Methods Enzymol., **47**, 145—149 (1977).
101. *Lasky M.*, In: Electrophoresis '78, Catsimpoolas N. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1978, pp. 195—210.
102. *Leighton P. H., Fisher W. K., Moon K. E., Thompson E. O. P.*, Aust. J. Biol. Sci., **33**, 513—520 (1980).

103. *Light N. D., Bailey A. J.*, In: Fibrous Proteins: Scientific, Industrial and Medical Aspects, Parry D. A. D., Creamer L. K. (Eds.), vol. 1, Academic Press, New York, 1979, pp. 151—177.
104. *Lin A. W. M., Castell D. O.*, Anal. Biochem., **86**, 345—356 (1978).
105. *Liu T. Y.*, In: The Proteins, III, 3rd edn., Neurath H., Hill R. L. (Eds.), Academic Press, New York, 1977, pp. 239—402.
106. *Lockridge O., Eckerson H. W., La Du B. N.*, J. Biol. Chem., **254**, 8324—8330 (1979).
107. *Loewy A. G.*, Methods Enzymol., **107**, 241—257 (1984).
108. *McElvain M., Schroeder J. P.*, J. Am. Chem. Soc., **71**, 40—46 (1949).
109. *Maclaren J. A., Milligan B.*, Wool Science: The Chemical Reactivity of the Wool Fibre, Science Press, Sydney, 1981.
110. *Mahuron D.*, J. Chromatogr., **172**, 394—396 (1979).
111. *Mann K. G., Fish W. W.*, Methods Enzymol., **26**, 28—42 (1972).
112. *Manwell C.*, Biochem. J., **165**, 487—495 (1977).
113. *Margolis J., Kenrick K. G.*, Anal. Biochem., 25, 347—362 (1968).
114. *Marshall R. C.*, J. Invest. Derm., **75**, 264—269 (1980).
115. *Marshall R. C.*, Text. Res. J., **51**, 106—108 (1981).
116. *Marshall R. C., Blagrove R. J.*, J. Chromatogr., **172**, 351—356 (1979).
117. *Matacic S. S., Loewy A. G.*, Biochim. Biophys. Acta, **576**, 263—268 (1979).
118. *Matheka H. D., Enzmann P. J., Bachrach H. L., Migl B.*, Anal. Biochem., **81**, 9—17 (1977).
119. *Maurer H. R.* (Ed.), In: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, 2nd edn., Walter de Gruyter, Berlin, 1971.
120. *Meighen E. A., Schachman H. K.*, Biochemistry, **9**, 1163—1176 (1970).
121. *Mendel-Hartveg I.*, Anal. Biochem., **121**, 215—217 (1982).
122. *Monsigny M., Seine C., Obrenovitch A., Roche A., Delmotte F., Boschetti E.*, Eur. J. Biochem., **98**, 39—45 (1979).
123. *Morgan G., Ramsden D. B.*, J. Chromatogr., **161**, 319—323 (1978).
124. *Mort A. J., Lamport D. T. A.*, Anal. Biochem., **82**, 289—309 (1977).
125. *Muranova T. A., Muranov A. V.*, Sov. J. Bioorg. Chem., **5**, 747—750 (1979).
126. *Noel D., Nikaido K., Ames G. F.*, Biochemistry, **18**, 4159—4165 (1979).
127. *Nozaki Y.*, Methods Enzymol., **26**, 43—50 (1972).
128. *O'Farrell P. H.*, J. Biol. Chem., **250**, 4007—4021 (1975).
129. *Paz M. A., Pereyra B., Gallop P. M., Seifter S.*, J. Mechanochem. Cell Motility, **2**, 231—239 (1974).
130. *Pereyra B., Blumenfeld O. O., Paz M. A., Henson E., Gallop P. M.*, J. Biol. Chem., **249**, 2212—2219 (1974).
131. *Perham R. N.*, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, **272**, 123—136 (1975).
132. *Peters K., Richards F. M.*, Ann. Rev. Biochem., **46**, 523—551 (1975).
133. *Peterson E. A.*, In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol 2, Work T. S., Work E. (Eds.), North-Holland, Amsterdam, Oxford, 1970, pp. 223—396
134 Pharmacia, Gel Filtration Theory and Practice, Uppsala, Sweden, 1979.
135. *Pillai S., Bachhawat B. K.*, J. Mol. Biol., **131**, 877—881 (1979).
136. *Podell D. N., Abraham G. N.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **81**, 176—185 (1978).
137. *Poduslo J. F., Podbard D.*, Anal. Biochem., **101**, 394—406 (1980).
138. *Poehling H.-M., Neuhoff V.*, Electrophoresis, **2**, 141—147 (1981).
139. *Prestidge R. L., Hearn M. T. W.*, Anal. Biochem., **97**, 95—102 (1979).
140. *Radola B. J.*, Biochim. Biophys. Acta., **295**, 412—428 (1973).
141. *Radola B. J.*, Biochim. Biophys. Acta., **386**, 181—195 (1974).
142. *Reid M. S., Bieleski B. L.*, Anal. Biochem., **22**, 374—381 (1968).
143. *Reynolds J. A., Tanford C.*, J. Biol. Chem., **245**, 5161—5165 (1970).

144. *Righetti P. G., Drysdale J. W.*, J. Chromatogr., **98**, 271—321 (1974).
145. *Robins S. P., Bailey A. J.*, FEBS Lett., **38**, 334—336 (1974).
146. *Robins S. P., Bailey A. J.*, Biochem. J., **149**, 381—385 (1975).
147. *Robins S. P., Bailey A. J.*, Biochem. J., **163**, 339—346 (1977).
148. *Rodbard D.*, In: Methods of Protein Separation, vol. 2, Catsimpoolas N. (Ed.), Plenum Press, New York, 1976, pp. 145—179.
149. *Rodbard D.*, In: Methods of Protein Separation, vol. 2, Catsimpoolas N. (Ed.), Plenum Press, New York, 1976, pp. 181—218.
150. *Rüegg U. T., Rudinger J.*, Int. J. Pept. Prot. Res., **6**, 447—456 (1974).
151. *Rüegg U. T., Rudinger J.*, Methods Enzymol., **47**, 111—116 (1977).
152. *Rüegg U. T., Rudinger J.*, Methods Enzymol., **47**, 116—122 (1977).
153. *Rüegg U. T., Jarvis D., Rudinger J.*, Biochem. J., **179**, 127—134 (1979).
154. *Sammons D. W., Adams L. D., Nishizawa E. E.*, Electrophoresis, **2**, 135—141 (1981).
155. *Savige W. E., Fontana A.*, Methods Enzymol., **47**, 442—453 (1977a).
156. *Savige W. E., Fontana A.*, Methods Enzymol., **47**, 453—459 (1977b).
157. *Scanu A. M., Edelstein C.*, Anal. Biochem., **44**, 576—588 (1971).
158. *Schirmer R. H., Untucht-Grau R., Pai E. F., Schulz G. E.*, In: Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Second Internat. Conf., Previero A., Coletti-Previero M.-A. (Eds.), North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1977, pp. 265—276.
159. *Schlesinger M.*, Cell, **17**, 813—819 (1979).
160. *Schram E., Moore S., Bigwood E. J.*, Biochem. J., **57**, 33—37 (1954).
161. *Schreiber G., Dryburgh H., Millership A., Matsuda Y., Inglis A., Phillips J., Edwards K., Maggs J.*, J. Biol. Chem., **254**, 12013—12019 (1979).
162. *Schwam H., Michelson S., Randall W. C., Sondey J. M., Hirschmann R.*, Biochemistry, **18**, 2828—2833 (1979).
163. *Scopes R. K.*, In: Techniques of Protein and Enzyme Biochemistry B101, Elsevier/North-Holland, Shannon, 1978, pp. 1—42.
164. *Segrest J. P., Jackson R. L.*, Methods Enzymol., **28**, 54—63 (1972).
165. *Siezen R. J.*, FEBS Lett., **100**, 75—80 (1979).
166 *Stark G. R.*, Biochemistry, **4**, 1030—1036 (1965).
167. *Stegemann H.*, In: Electrokinetic Separation Methods, Righetti P. G., Van Oss C. J., Vanderhoff J. W. (Eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1979, pp. 313—336.
168. *Steinert P. M., Idler W. W.*, Biochem. J., **151**, 603—614 (1975).
169. *Stimler N. P., Tanzer M. L.*, Biochim. Biophys. Acta, **365**, 425—433 (1974)
170. *Studier F. W.*, J. Mol. Biol., **79**, 237—248 (1973).
171. *Sutoh K., Chiao Y.-C. C., Harrington W. F.*, Biochemistry, **17**, 1234—1239 (1978).
172. *Tanzer M. L.*, In: Biochemistry of Collagen, Ramachandran G. N., Reddi A. H. (Eds.), Plenum Press, New York, 1976, pp. 137—162.
173. *Thomas J. O.*, In: Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry B 106, Elsevier/North-Holland, Shannon, 1978, pp. 1—22.
174. *Thompson E. O. P., O'Donnell I. J.*, Aust. J. Biol. Sci., **19**, 1139—1151 (1966).
175. *Tuszynski G. P., Damsky C. H., Fuhrer J. P., Warren L.*, Anal. Biochem., **83**, 119—129 (1977).
176. *Ui N.*, Biochim. Biophys. Acta., **229**, 567—581 (1971).
177. *Van Holde K. E.*, In: The Proteins, I, 3rd edn., Neurath H., Hill R. L. (Eds.), Academic Press, New York, 1975, pp. 225—291.
178. *Vinograd J. R., Hutchinson W. D., Schroeder W. A.*, J. Am. Chem. Soc., **81**, 3168—3169 (1959).
179. *Von Hippel P. H., Schleich T.*, In: Structure and Stability of Biological Macromolecules, Timasheff S. N., Fasman G. D. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1969, pp. 417—454.

180. *Walker J. E., Auffret A. D., Carne A. F., Naughton M. A., Runswick M. J.*, In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, Proc. Third Internat. Conf., Birr C. (Ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1980, pp. 257—265.
181. *Ward C. W., Dopheide T. A. A.*, Virology, **103**, 37—53 (1980).
182. *Weber K., Osborn M.*, J. Biol. Chem., **244**, 4406—4412 (1969).
183. *Weber K., Osborn M.*, In: The Proteins, I, 3rd edn., Neurath H., Hill R. L (Eds.), Academic Press, New York, 1975, pp. 179—223.
184. *Wieland F., Renner L., Verfurth C., Lynen F.*, Eur. J. Biochem., **94**, 189—197 (1979).
185. *Wright D. J., Boulter D.*, Biochem. J., **141**, 413—418 (1974).
186. *Yamato S., Murachi T.*, Eur. J. Biochem., **93**, 189—195 (1979).

Глава 2

ФРАГМЕНТАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

А. ФОНТАНА (A. FONTANA, *Institute of Organic Chemistry (Biopolymer Research Centre, C.N.R.), University of Padova, Padova, Italy*), Э. ГРОСС (E. GROSS, *National Institute of Child Health and Human Development, Endocrinology and Reproduction Research Branch, Section on Molecular Structure, Bethesda, Maryland 20205, U.S.A.*)

2.1. Введение

Как правило, первичную структуру белка не удается установить путем последовательного секвенирования всей полипептидной цепи. Для этого приходится анализировать фрагменты, полученные избирательным расщеплением полипептидной цепи химическим или ферментативным методом. Следовательно, стадия фрагментации полипептидной цепи на низкомолекулярные пептиды с целью последующего структурного анализа — это один из важнейших этапов в определении ковалентной (первичной) структуры белка.

В этой главе рассматриваются способы фрагментации полипептидных цепей химическими методами; вопросам ферментативного гидролиза посвящены гл. 3 и 10.

В основе химических методов расщепления лежит способность модифицированных химическим путем аминокислотных остатков активировать полипептидные связи прилегающих звеньев цепи [20, 21]. В химии белка многие годы используется расщепление по остаткам некоторых аминокислот. Приемлемый на практике способ избирательного химического расщепления полипептидных цепей должен удовлетворять двум требованиям: обладать высокой избирательностью и обеспечивать высокий выход. В идеальном случае при расщеплении отдельной пептидной связи не должно происходить побочных реакций. Однако на практике известные методы химического расщепления не лишены недостатков; прежде всего к ним относятся низкий выход продуктов реакции и нежелательные побочные реакции.

Одно из основных требований, предъявляемых к методике фрагментации, касается высокой специфичности, т. е. речь идет о разрыве лишь немногих полипептидных связей, в результате чего образуется смесь пептидов, которую довольно легко разделить. Принципиально имеется возможность определения достаточно протяженной последовательности аминокислот путем автоматического секвенирования, однако гораздо практичнее получить небольшой набор крупных фрагментов, которые пос-

ле разделения послужат более удобными объектами автоматического секвенирования. Потенциальными мишенями для действия химических реагентов с целью ограниченной фрагментации являются функциональные группы относительно редких аминокислот, например метионина, триптофана и цистеина.

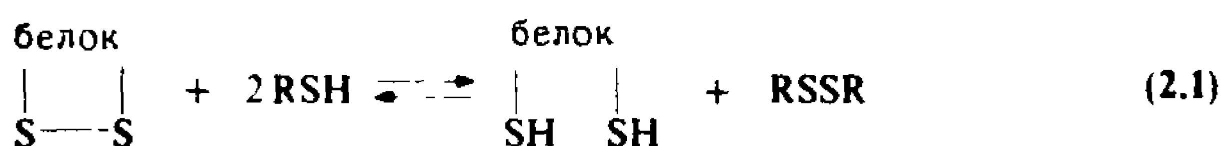
Потребность в методиках получения крупных фрагментов стимулирует все больший интерес к развитию специфических методов расщепления. В настоящей главе обсуждаются главным образом те методы, которые проверены на практике и нашли практическое применение. Наряду с хорошо известными методами расщепления по метионину, триптофану, тирозину и цистеину в данной главе рассматриваются также частичный кислотный гидролиз и восстановительное и окислительное расщепление по остаткам цистина. Литература по химической фрагментации пептидов и белков хорошо известна, поэтому авторы не ставили перед собой задачу охватить все аспекты проблемы. Читатель, проявляющий более глубокий интерес к этой тематике, может найти разнообразную информацию в обстоятельных обзорах [4, 74, 78, 81, 83, 181, 209].

2.2. Расщепление дисульфидных связей

Остатки цистина могут образовывать как внутри-, так и межцепочечные связи. Поэтому при секвенировании обязательным этапом является расщепление дисульфидных связей в первую очередь с целью разделения полипептидных цепей. В то же время дисульфидные связи имеют высокую реакционную способность, и это обстоятельство может вызвать осложнение при структурном анализе. Поэтому при расщеплении S—S-групп остатки цистеина необходимо перевести в стабильные производные. Наконец, после восстановления остатков цистеина белки становятся более доступными действию протеолитических ферментов. Способы расщепления дисульфидных связей рассматриваются в гл. 4. По этому вопросу имеется также ряд обзоров [26, 59, 98, 116]. В настоящую главу включены только те методики, которые нашли практическое применение.

2.2.1. Восстановление и S-карбоксиметилирование

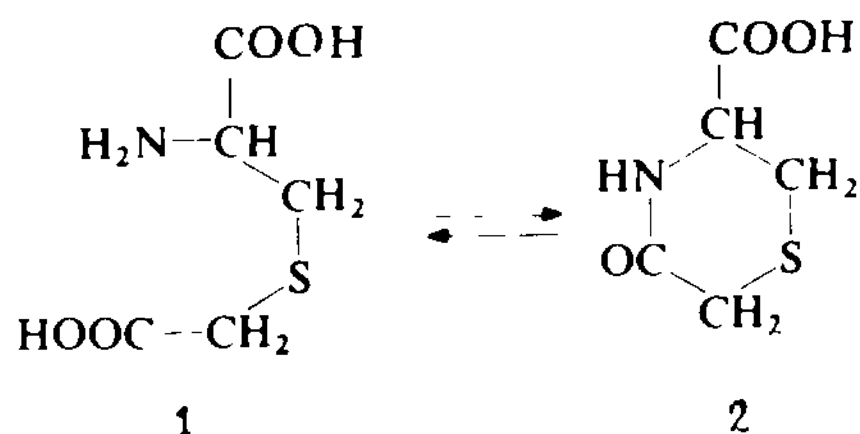
К наиболее избирательным и практичным методам расщепления S—S-связей относится восстановление. Типовая методика заключается в обработке белка избытком низкомолекулярного тиола [уравнение (2.1)]. В качестве тиолов используют цисте-



ин, восстановленный глутатион, 2-меркаптоэтиламин, тиогликолевую кислоту, 2-меркаптоэтанол [78—80, 203] и дитиотреит (ДТТ) [29]. Восстановление проводят в атмосфере инертного газа в слабощелочной среде в присутствии 8 *М* мочевины или 6 *М* гуанидин-HCl. Следует напомнить, что при длительном хранении в растворах мочевины идет образование цианат-ионов, которые вызывают модификацию белков [182]. Рекомендуется использовать предварительно перекристаллизованные препараты мочевины, свежеприготовленный раствор следует деионизировать на смешанном ионите.

После удаления восстановителя тиольные группы легко окисляются кислородом воздуха с замыканием S—S-связей. Поэтому для защиты SH-групп используют разнообразные группировки, получая устойчивые производные цистеина непосредственно в реакционной смеси, в которой проводилось восстановление. В качестве SH-реагента наиболее часто используется иодоуксусная кислота. Остатки цистеина переводятся при этом в S-карбоксиметилцистеин, который вполне устойчив при последующих операциях, включая секвенирование. Степень модификации определяют по данным аминокислотного анализа, используя устойчивость S-карбоксиметилцистеина в условиях кислотного гидролиза. При этом одновременно определяют возможные потери других аминокислот (метионина, тирозина, гистидина) в результате побочных реакций [71].

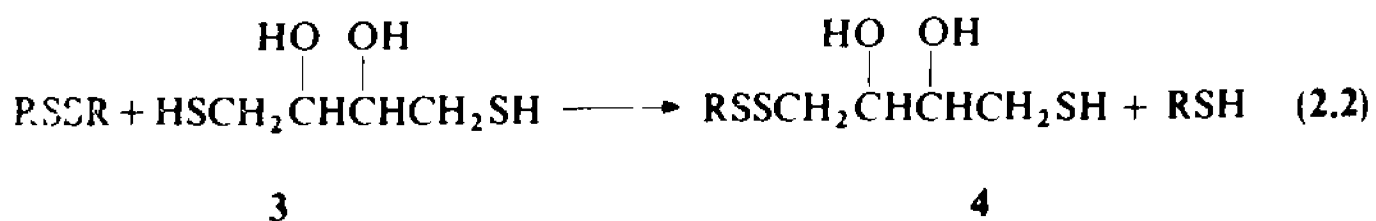
Показано, что в кислой среде S-карбоксиметилцистеин (1) может подвергаться внутримолекулярной циклизации с образованием замещенного тиазина (2), который невозможно обнаружить с помощью аминокислотного анализа из-за потери

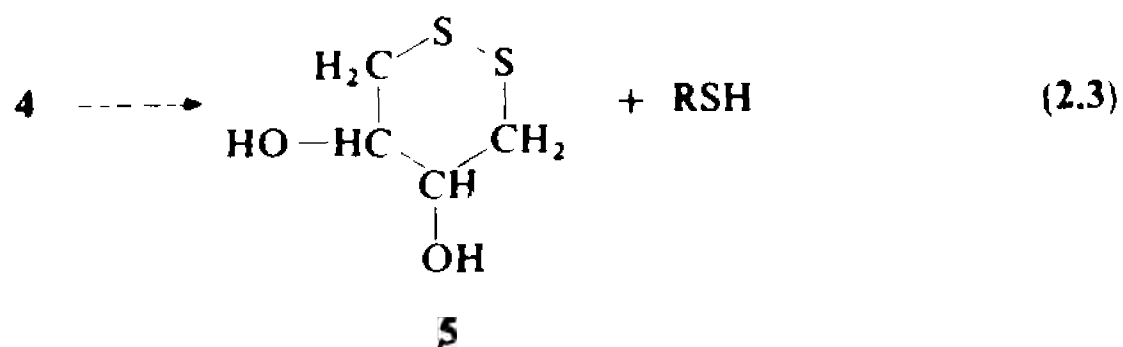


аминогруппы [15]. Скорость этой реакции зависит от температуры и pH. Оптимальные условия циклизации соответствуют pH 3,0 (цитратный буфер) и температуре 110 °C, в то время как в обычных условиях кислотного гидролиза (6 *М* HCl, 110 °C, 22 ч) S-карбоксиметилцистеин вполне устойчив. С целью исключить возможность потери S-карбоксиметилцистеина в результате циклизации рекомендуется алкилировать SH-группы 3-бромопропионовой кислотой [15].

Типовая методика восстановления дисульфидных связей рибонуклеазы 2-меркаптоэтанолом и последующего карбокси-

метилирования приведена в работах [3, 35, 102]. В настоящее время наиболее широкое применение в качестве восстановителя находит дитиотреит (3) [106]. (Этот реагент — реактив Клеланда — был впервые применен для восстановления дисульфидов Клеландом [29].)





Реакция идет, согласно уравнениям (2.2) и (2.3), почти количественно благодаря образованию более энергетически выгодного по сравнению с дисульфидами смешанного типа шестичленного цикла (5). При pH 7 и 25 °C окислительно-восстановительный потенциал дитиотреита составляет —0,33 В (для цистеина —0,22 В); отсюда константа суммарной реакции восстановления цистеина с помощью дитиотреита равна 10^4. Благодаря более низкому окислительно-восстановительному потенциалу и устойчивости к действию кислорода воздуха дитиотреит можно вводить в реакции в гораздо меньших концентрациях по сравнению с другими тиолами. Дополнительное преимущество использования дитиотреита связано с почти полным отсутствием у него неприятного запаха.

2.2.1.1. Восстановление и S-карбоксиметилирование. Методика [200]. Раствор белка (10—20 мг/мл) в 0,2—0,5 *М* *трис*-HCl-буфере (pH 8,0), содержащем 6 *М* гуанидин-HCl и 2 мМ ЭДТА, в пробирке из полипропилена продувают азотом, плотно закрывают и инкубируют при 37—50 °C в течение 30 мин. Затем добавляют 50-кратный молярный избыток (в расчете на S—S-группу) ДТТ, а если количество S—S-связей неизвестно — 300 моль/моль белка, продувают азотом и инкубируют при 37 °C в течение 4 ч.

Реакционную смесь охлаждают до 0 °C, добавляют небольшой избыток (в расчете на SH-группу) перекристаллизованной иодоуксусной кислоты или иодоацетамида и инкубируют без доступа света. В процессе реакции в среде поддерживают pH 8,0. Спустя 1 ч избыток реагента нейтрализуют с помощью 2-меркаптоэтанола и раствор диализуют при щелочном pH и пониженной температуре. Указанные условия диализа препятствуют модификации метионина, которая вполне возможна, если вести диализ против кислотного буфера. С целью обессоливания можно проводить гель-фильтрацию в подходящем буфере (на сефадексе G-10 или биогеле P-10 в 0,01 м NH_4HCO_3).

2.2.1.2. Восстановление трибутилфосфином. Эффективным и избирательным восстановителем дисульфидных связей в кератине (шерсти) является трибутилфосфин [119]. При исследовании восстановления белков известного строения было показано [152], что реакция идет стехиометрически согласно уравнению:



$$R_1SSR_2 + Bu_3P + H_2O \longrightarrow R_1SH + Bu_3PO \qquad (2.4)$$

При этом избыток восстановителя в расчете на S—S-группы составил 5—20%. В щелочной среде реакция идет с высокой скоростью, избирательно, почти количественно. Алкилирование образующихся SH-групп можно вести в присутствии восстановителя. В кислой среде реакция идет с низкой скоростью (время реакции 24—48 ч). Гомогенность среды создают добавлением 1-пропанола (до соотношения 1 : 1), что дополнительно способствует солюбилизации белка. Трибутилфосфин токсичен и имеет неприятный запах, работать с ним необходимо в вытяжном шкафу. Реагент и приготовленные растворы рекомендуется хранить под азотом, 2%-ный (об./об.) раствор в пропаноле имеет восстановительный эквивалент 55—70 мкмоль/мл.

Методика, предложенная в работе [152]. Бычью панкреатическую рибонуклеазу (64 мг, 5 мкмоль) растворяют в 7,5 мл 7 М мочевины в 0,1 М трис-HCl (pH 8,2), содержащем 1-пропанол (2 : 1). При перемешивании в атмосфере азота добавляют 50 мкл (130—180 мкмоль, 6—9-кратный избыток) трибутилфосфина. Спустя 2 ч добавляют 140 мкл 1 М иодоацетата (1 М иодоуксусной кислоты в 1 М NaOH, 3,5-кратный избыток в расчете на SH-группы) и инкубируют без доступа света. Спустя 5 мин доводят pH до 8,2 с помощью 1 М Na_2CO_3; спустя 30 мин добавляют 0,5 мл ледяной уксусной кислоты и высушивают лиофильно.

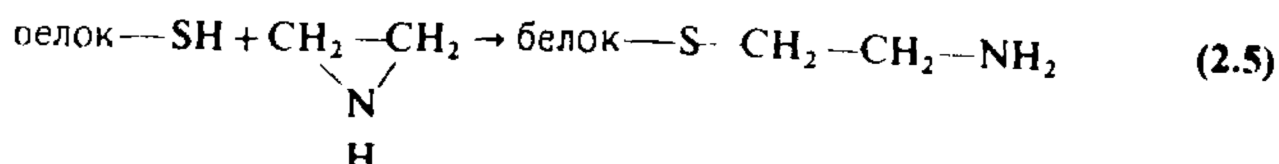
Дисульфидные связи можно восстанавливать с помощью других реагентов; однако эти методы не находят применения в аналитической химии белка. Например, восстановление борогидридом натрия (при pH 7—10) сопровождается расщеплением пептидных связей [35]; при реакции с дибораном идет восстановление карбоксильных групп (в виде карбоксилат-иона) в гидроксильные [5, 6]. В принципе диборанами можно восстанавливать белки с непротонированными карбоксильными группами. Редко в химии белка применяется электролитическое восстановление на ртутном капельном электроде [27, 111].

2.2.2. Другие защитные группы (по SH-группе)

Защитные группы должны удовлетворять разнообразным требованиям. В частности, защитная группа должна обеспечивать высокую растворимость модифицированного белка, нести хромофорную или флуоресцирующую группу или превращать модифицированный цистеин в потенциальный субстрат трипсина, наконец реакция модификации должна быть по возможности

обратимой. В принципе сульфгидрильные группы, как наиболее реакционноспособные группы в белках, легко вступают в реакции алкилирования, арилирования, образуют комплексы с солями тяжелых металлов [59, 98, 104, 193].

2.2.2.1. Алкилирование с помощью этиленимина. S-Аминоэтилцистеин — положительно заряженное производное цистеина — получают по реакции с этиленимином согласно уравнению (2.5) [114, 145, 146]. С помощью этой реакции в полипептидной



цепи создают аналог лизина — хорошую мишень для атаки трипсином. Однако протеолиз в этом случае идет с более низкой скоростью по сравнению с гидролизом по остаткам лизина и аргинина [32]. Алкилирование с помощью этиленимина сопровождается рядом побочных реакций, в частности может идти алкилирование метионина [166] или α-аминогруппы N-концевой аминокислоты [174]. При проведении реакции в течение длительного времени или в присутствии большого избытка реагента вероятность побочных реакций существенно возрастает. При аминокислотном анализе S-аминоэтилцистеин элюируется в области основных аминокислот [166].

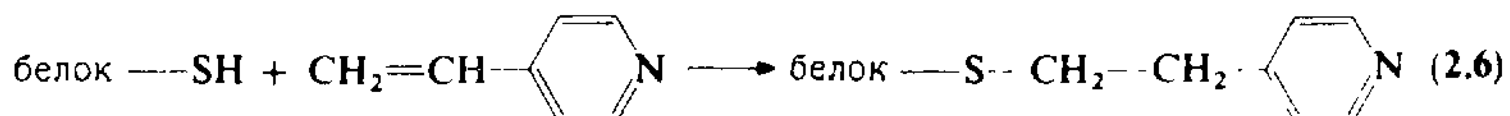
Восстановление трибутилфосфином и алкилирование этиленимином. *Методика 1.* Растворяют белок (2—10 мг/мл) в смеси 0,5 М $NaHCO_3$ — *н*-пропанол (1 : 1), устанавливают pH 8,0—8,3 и при перемешивании под азотом добавляют трибутилфосфин (1—5 мкмоль/мг белка) и этиленимин (4—40 мкмоль/мг белка); инкубируют в течение 2—4 ч.

Методика 2 [185]. Белок (25 мг γ-глобулина) растворяют в 5 мл свежеприготовленного раствора 8 М мочевины или 6 М гуанидин-HCl в 1 М трис-HCl-буфере (pH 8,9), содержащем 75 мкл 2-меркаптоэтанола. Инкубируют в атмосфере азота при 20 °C в течение 2 ч. Затем добавляют 150 мкл этиленимина и инкубируют в течение 2 ч. Реакционную смесь диализуют против 100 объемов 1-%ного NH_4HCO_3, затем против дистиллированной воды и высушивают лиофильно.

Методика 1. Алкилирование с помощью 4-винилпиридина [92]. Навеску белка (300—500 мг) растворяют под азотом в 20—30 мл трис-HCl-буфера (pH 7,5), содержащего 8 М мочевину, добавляют 4-винилпиридин (20 молей на 1 «мол.» SH-группы) и инкубируют при перемешивании в течение 2—3 ч. Затем подкисляют ледяной уксусной кислотой до pH 3, диализуют против 0,01 М уксусной кислоты и высушивают лиофильно.

2.2.2.2. Алкилирование с помощью 4-винилпиридина [25, 60]. Реакция идет согласно уравнению (2.6). С помощью 4-винилпиридина в полипептидную цепь вводят полярную группировку, которая повышает растворимость белка и способствует его последующей очистке. Модифицированный остаток цистеина устойчив в условиях кислотного гидролиза, имеет характерное

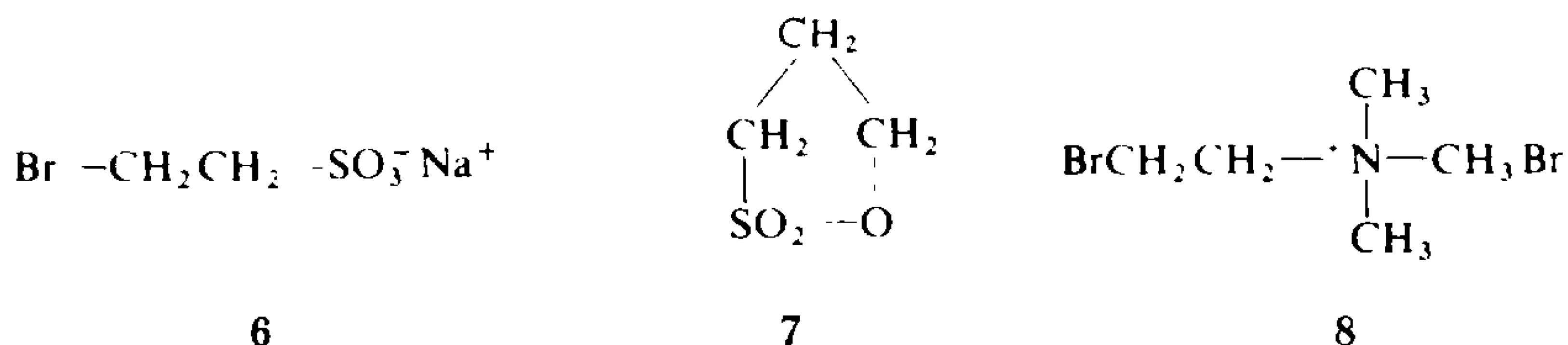
поглощение при 260 нм, его ФТГ-производное легко идентифицируется при секвенировании [75].



Методика 1. Алкилирование с помощью 4-винилпиридина [92]. Навеску белка (300—500 мг) растворяют под азотом в 20—30 мл трис-HCl-буфера (pH 7,5), содержащего 8 М мочевину, добавляют 4-винилпиридин (20 молей на 1 «моль» SH-группы) и инкубируют при перемешивании в течение 2—3 ч. Затем подкисляют ледяной уксусной кислотой до pH 3, диализуют против 0,01 М уксусной кислоты и высушивают лиофильно.

Методика 2. Восстановление дитиотреитом и алкирование 4-винилпиридином [75]. Свиной трипсин (20 мг) растворяют в 1 мл буфера следующего состава (pH 7,6): 0,13 М трис-HCl+6 М гуанидин-HCl+0,1 мг ЭДТА. Прибавляют ДТТ (20 молей на 1 «моль» S—S-группы), инкубируют при 20 °C в течение 3 ч. Добавляют 4-винилпиридин в количестве 3 моль/моль ДТТ, инкубируют в течение 90 мин. Реакционную смесь подкисляют 88%-ной муравьиной кислотой до pH 2,0 и фракционируют с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 в 9%-ной муравьиной кислоте. Получают три фракции, соответствующие цепи β-трипсина и двум фрагментам α-трипсина.

2.2.2.3. Другие SH-алкилирующие реагенты. С целью введения в полипептидную цепь заряженных группировок предложено алкилировать остатки цистеина 2-бромоэтансульфонатом (**6**) [129], 1,3-пропансультоном (**7**) [151, 153] и 2-бромоэтилтриме-

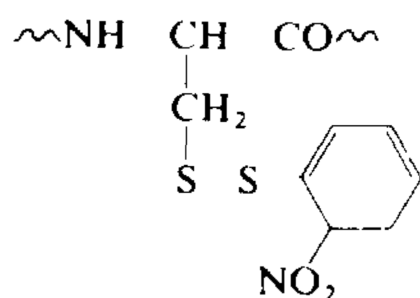


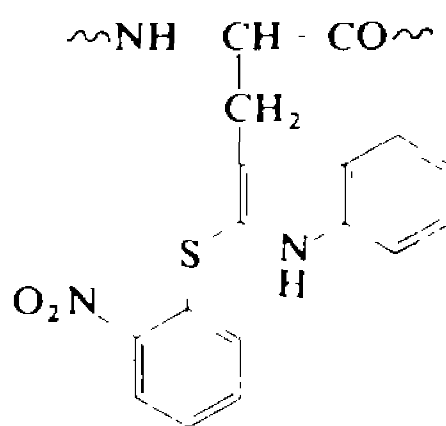
тиламмонийбромидом (**8**) [94]. Поскольку эти группировки сохраняют заряд в широком диапазоне pH, полученные производные можно фракционировать с помощью электрофоретических методов.

Методика. Восстановление и модификация 1,3-пропансультоном [151]. Рибонуклеазу (64 мг, 5 мкмоль) растворяют в 7,5 мл буфера следующего состава: 0,1 М трис-HCl (pH 8,2)+*н*-пропанол (2 : 1)+7 М мочевина; раствор деаэрируют и насыщают азотом. Затем прибавляют трибутилфосфин (22—40 мкмоль, 1,1—2-кратный избыток) в виде 5%-ного раствора в пропаноле и 320 мкл (80 мкмоль) 250 мМ раствора 1,3-пропансультона в водном пропаноле (1 : 1), инкубируют при 20 °C в течение 16 ч. Реакционную смесь подкисляют уксусной кислотой, трижды диализуют при пониженной температуре против 0,1%-ной уксусной кислоты и высушивают лиофильно.

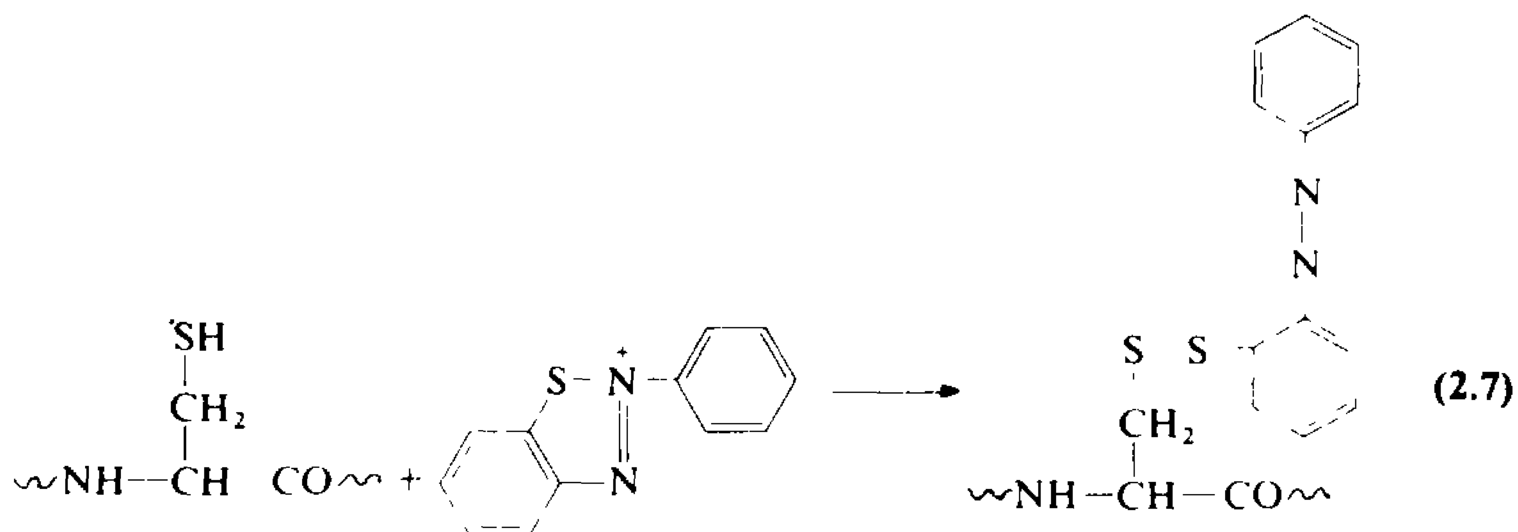
2.2.2.4. Обратимая защита тиольной группы. Иногда возникает необходимость обратимой защиты тиольной группы, т. е. введения защитной группы, которая впоследствии может быть уда-

лена. Обратимую защиту остатков цистеина в белках осуществляют путем образования смешанных дисульфидов, которые легко расщепляются при восстановлении. К классу смешанных (несимметричных) дисульфидов относятся продукты реакции цистеина с арилсульфенил-галогенидами [46, 48]. 2-Нитрофенилсульфенилхлорид реагирует в водной уксусной кислоте с остатком цистеина, образуя смешанный дисульфид (**9**), а также с остатком триптофана с образованием тиоэфира (**10**). Азобензол-2-сульфенилбромид взаимодействует с SH-группой, согласно уравнению (2.7), и не реагирует с триптофаном. Отсутствие реакции с индольным циклом триптофана объясняется особенностями строения иона 2-фенилбензо-1-тио-2,3-диазония (**11**).





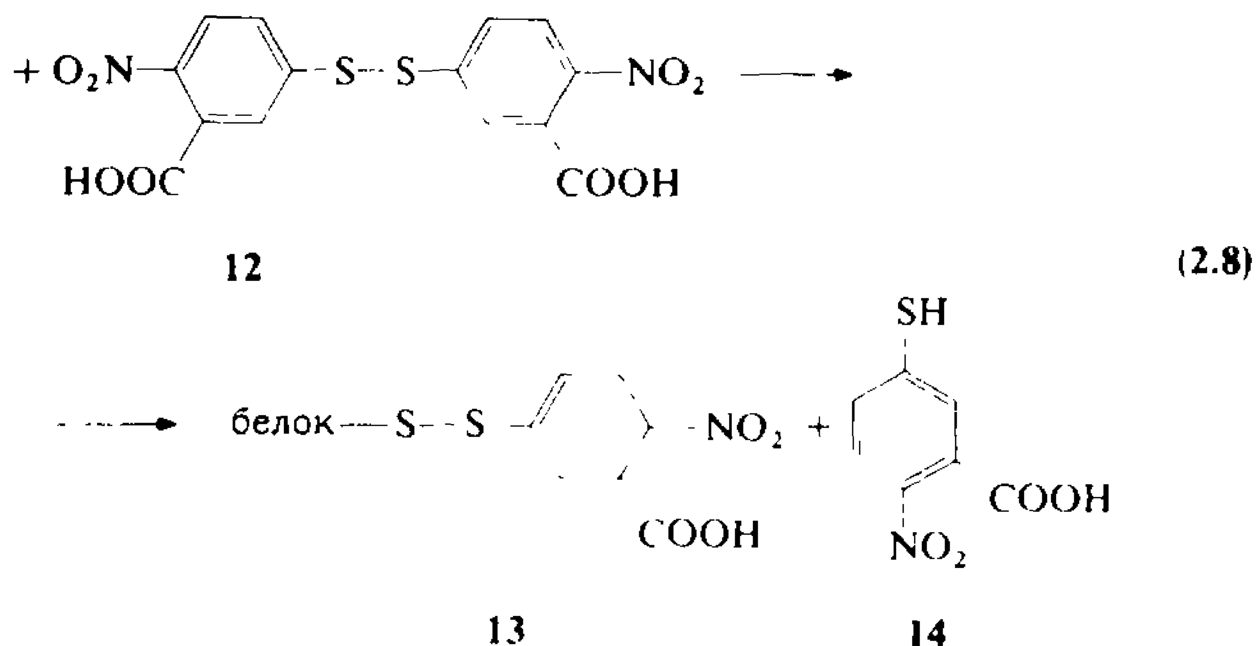
9 **10**



11

Смешанные алкиларилдисульфиды образуются при взаимодействии остатка цистеина с 5,5′-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой (**12**) (ДТНБ), называемой реактивом Эллмана [43], согласно уравнению (2.8). ДТНБ имеет более высокий по сравнению с алифатическими дисульфидами окислительно-восстановительный потенциал, поэтому при взаимодействии с алифатическими тиолами идет реакция обмена с образованием смешанного дисульфида и окрашенного иона 2-нитро-5-тиобензоата (**14**). Реактив Эллмана находит широкое применение для количественного определения остатков цистеина в белках [72].

Показано, что алкилалкантиосульфонат как специфический реагент на SH-группы также образует смешанные дисульфиды



согласно уравнению (2.9). Реакция идет с высокой скоростью в мягких условиях

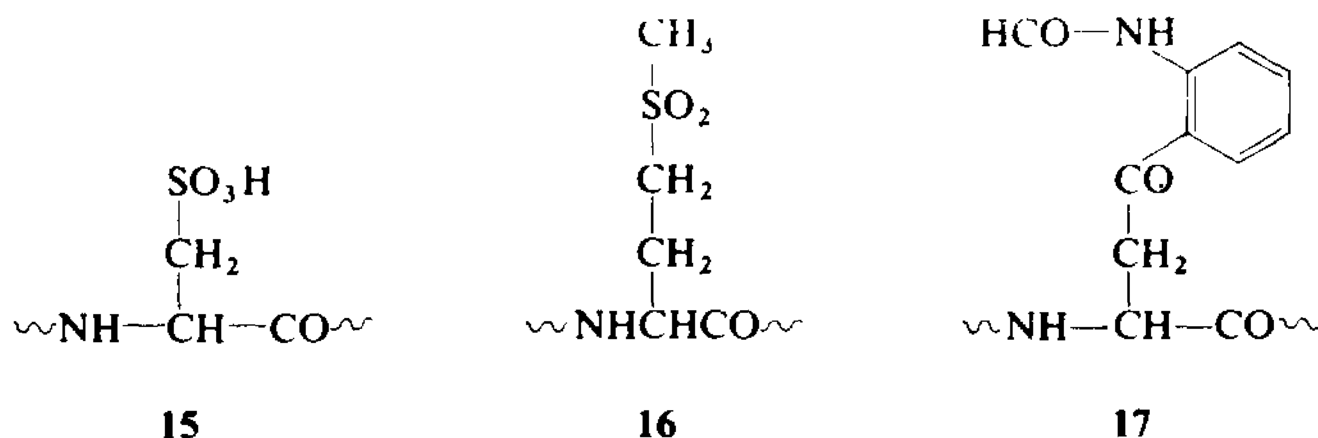


$$\text{белок-SH} + \text{R-S-SO}_2\text{-R} \longrightarrow \text{белок-S-S-R} + \text{R-SO}_2\text{H} \qquad (2.9)$$

и не требует избытка реагента [104, 176]. К наиболее известным реагентам этого типа относится метилметантиолсульфонат, с помощью которого в тиолосодержащий белок вводят CH_3S-группу.

2.2.3. Расщепление S—S-групп путем окисления

Окислительное расщепление S—S-групп в белках обычно проводят надмуравьиной кислотой. При этом остатки цистеина и цистина с выходом >90% превращаются в цистеиновую кислоту (**15**). Цистеиновая кислота стабильна при кислотном гидролизе; при анализе на аминокислотном анализаторе элюируется непосредственно перед аспарагиновой кислотой [180]. Этот



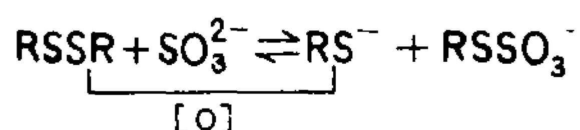
прием применяется для определения в белках суммарного содержания цистеина и цистина. При окислении метионин превращается в S—S-диоксид (**16**), триптофан — в N-формилкинуренин (**17**) и неидентифицированные продукты окисления

[7, 192], а тирозин — частично в галогенпроизводные [77, 160]. Попытки найти условия избирательного окисления цистина и цистеина с целью свести к минимуму побочные реакции других аминокислот или по крайней мере добиться образования хорошо идентифицируемых продуктов окисления оказались безуспешными. Впервые окисление надмуравьиной кислотой применялось при изучении инсулина [157] и рибонуклеазы [77, 84].

2.2.3.1. Окисление надмуравьиной кислотой. Для получения надмуравьиной кислоты смешивают 99%-ную муравьиную кислоту и 30%-ный пероксид водорода в соотношении 95:5 и оставляют стоять в закрытом сосуде при комнатной температуре в течение 2 ч. К этому времени содержание надмуравьиной кислоты в реакционной смеси достигает максимального, а затем постепенно снижается. Навеску белка растворяют в 99%-ной муравьиной кислоте, добавляют метанол (до 20%-ной концентрации), охлаждают до —5 °С и добавляют надмуравьиную кислоту (1 мл на 5 мг белка) в соотношении 2:1. Окончательная концентрация белка в реакционной смеси составляет ~0,5%. Инкубируют при —5÷—10 °С в течение 2—3 ч, разбавляют водой и высушивают лиофильно. Белок можно выделить из раствора осаждением трихлороуксусной кислотой или органическим растворителем. Реакционную смесь можно разбавить вдвое охлажденной водой и диализовать на холоду против воды (дважды) и 1 мМ 2-меркаптоэтанола, а затем высушить лиофильно. См. также разд. 1.5.1.1.

2.2.4. Реакция с сульфитом

При действии на дисульфиды сульфит-иона образуются S-сульфосоединения и тиолы [уравнение (2.10)]. Тиолы вновь окисляются до дисульфидов, которые в итоге полностью переходят в S-сульфонаты [26, 31, 116].



Сульфитолиз применяют в качестве мягкого метода расщепления дисульфидных связей в белках. S-сульфопротеины стабильны в кислой и нейтральной области pH, хорошо растворяются в воде. S-сульфогруппа легко восстанавливается тиолами, поэтому эту реакцию применяют с целью обратимого блокирования SH-групп цистеина при пептидном синтезе [16, 102, 150].

Известный метод определения полуцистина в белковых гидролизатах в виде S-сульфоцистеина основан на том, что цистеин или цистин восстанавливают дитиотреитом, а затем обраба-

Таблица 2.1. Примеры частичного кислотного гидролиза белков

Белок	Условия гидролиза	Литература
Инсулин	12 н. HCl, 37 °C, 3 сут	159
Лизоцим	12 н. HCl, 37 °C, 7 сут	190
Трипсин	5,7 н. HCl, 100 °C, 20—30 мин	128
Фосфоглюкомутаза	2 н. HCl, 100 °C, 30 мин	124
Рибонуклеаза, инсулин, глюкагон	0,03 н. HCl, 105 °C, 4—48 ч	65, 168

тывают избытком тетратионата натрия $Na_2S_4O_6$ [91, 118]. Первоначально предполагалось [139], что взаимодействие SH-групп с тетратионатом приводит к образованию S-сульфосульфенилпроизводного, а не S-сульфоцистеина. Однако оказалось [91], что в условиях эксперимента со свободным цистеином образуется исключительно S-сульфоцистеин, который на аминокислотном анализаторе элюируется рядом с цистеиновой кислотой [118]. Окислительный сульфитолиз рассматривается также в разд. 1.5.1.2.

2.3. Частичный кислотный гидролиз

Частичный кислотный гидролиз пептидных связей проводят в более мягких условиях по сравнению с исчерпывающим гидролизом до свободных аминокислот [101]. С целью фрагментации полипептидных цепей применяются два варианта методики: частичный гидролиз концентрированной соляной кислотой и гидролиз разбавленными кислотами. Относительная скорость гидролиза пептидной связи зависит от стерического и электростатического факторов. Показано, что наиболее устойчивы пептидные связи валина и лейцина [186], в особенности в дипептидах, образованных двумя разветвленными аминокислотами (например, Val-Ile и Ile-Ile). Можно полагать, что положительно заряженные основные группы будут отталкивать ион водорода, и именно это объясняет устойчивость дипептидов, накапливающихся в реакционной смеси к концу гидролиза.

Наиболее часто применяется соляная кислота, в специальных случаях — уксусная кислота в смеси с другими кислотами. Условия частичного кислотного гидролиза белков описаны в табл. 2.1.

Кислотный гидролиз идет не очень специфично с образованием гетерогенной смеси фрагментов. Например, при гидролизе A- и B-цепей инсулина [159] и лизоцима [190] было получено множество ди- и трипептидов, которые удалось выделить и охарактеризовать. Хотя секвенирование небольших пептидов не

составляет проблемы (при условии, что их удалось выделить), частичный кислотный гидролиз редко используется на практике, поскольку в настоящее время имеются быстрые и достоверные методы секвенирования довольно крупных фрагментов.

2.3.1. Расщепление связи Asp-Pro

Пептидная связь Asp-Pro особенно лабильна в условиях мягкого кислотного гидролиза [58, 73, 97, 108]. Избирательное расщепление может идти в кислой среде при гидролизе пепсином, при обработке белка раствором бромоциана в 70%-ной муравьиной кислоте или в процессе очистки пептидов гель-фильтрацией в водной уксусной или муравьиной кислоте. Частичный гидролиз связи Asp-Pro наблюдался, в частности, при обработке глутаматдегидрогеназы бромоцианом в 70%-ной муравьиной кислоте [140]; в этой же работе обсуждается вероятный механизм кислотного гидролиза пептидной связи Asp-Pro.

К сожалению, связь Asp-Pro встречается в белках достаточно редко; тем не менее этот прием полезен, поскольку позволяет получать относительно крупные фрагменты, удобные для автоматического секвенирования.

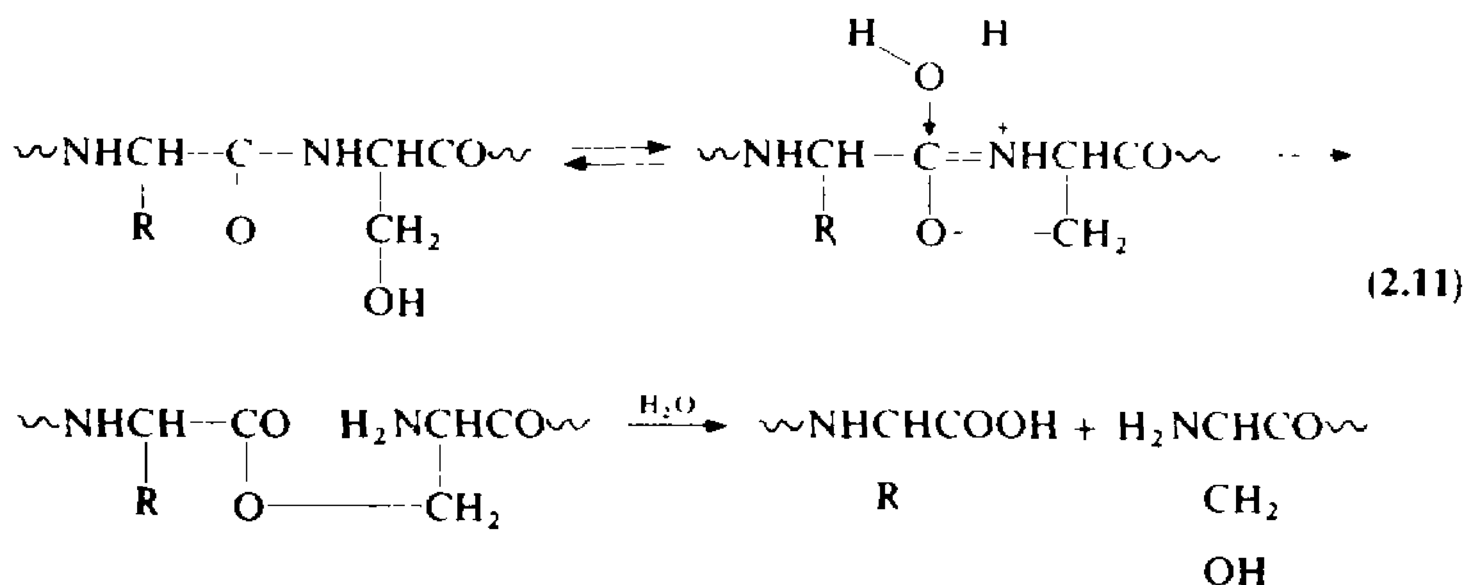
2.3.1.1. *Методика* [130]. S-Пиридилэтилпроизводное (полученное по реакции с 4-винилпиридином) γ-цепи фетального гемоглобина (51 мг) растворяют в 2 мл 70%-ной муравьиной кислоты, содержащей 7 M гуанидин-HCl, и инкубируют при 40 °C в течение 24 ч. Затем в реакционную смесь добавляют 2 мл охлажденной деионизированной воды и незамедлительно хроматографируют в 9%-ной уксусной кислоте на колонке (2×95 см) с сефадексом G-75 (супермелкий). C-Концевой фрагмент (остатки 100—146) получают после лиофильного высушивания соответствующих фракций и вторичного хроматографирования на колонке (2×95 см) с сефадексом G-50 (супермелкий) также в 9%-ной муравьиной кислоте.

2.3.2. N→O-ацильная миграция

Пептидные связи с участием аминогрупп серина и треонина также довольно легко гидролизуются в кислой среде при комнатной температуре; в особенности чувствительны к гидролизу серинсодержащие пептиды [95]. По-видимому, механизм гидролиза включает миграцию ацильной группы и последующий гидролиз сложноэфирной связи [уравнение (2.11)].

N→O-ацильная миграция идет в концентрированных безводных кислотах, таких, как серная, фосфорная, фтороводородная или муравьиная. Классическим реагентом, практически исключающим неспецифический гидролиз, является концентрированная

серная кислота [40, 42]. Показано, например, что инсулин после обработки серной кислотой сохраняет биологическую активность [62]. Однако при этом может идти частичное сульфирование тирозина и частичное разрушение триптофана.



(2.11)

При фрагментации по остаткам серина и треонина с помощью реакции N→O-ацильной миграции особого внимания заслуживает избирательный гидролиз сложноэфирной связи («О-пептидной» связи) по серину и треонину. В принципе гидролиз сложноэфирной связи можно проводить как в кислой, так и в основной среде. Поскольку, однако, в основной среде гидролиз приводит к образованию исходного ациламида, необходимо предварительно защитить аминогруппы путем ацилирования. Наличие защиты позволит исключить обратную реакцию O→N-ацильной миграции и тем самым обеспечить высокий выход продуктов реакции. Обратимость реакции миграции в основной среде объясняется образованием циклического гидроксиоксазолидина [95].

N-ацилирование проводят в присутствии большого избытка уксусного или муравьиного ангидрида. Для последующего секвенирования пептидных фрагментов необходимо провести гидролиз ацильных групп. Формильную защиту снимают кратковременной обработкой HCl в метаноле при комнатной температуре, более устойчивые ацетильные группы отщепляют 0,01 *М* KOH. Из других методов расщепления «О-пептидных» связей следует упомянуть реакцию с гидроксиламином или гидразином с образованием гидроксамовых кислот или гидразидов N-концевых партнеров гидроксиаминокислот (серина и треонина); для этих целей применяли также 1 *М* пиперидин [64]. Относительно определения ацетильных и формильных групп см. разд. 8.13.

Гидролиз сложноэфирных связей проводят также в 6 *М* HCl; однако, поскольку с увеличением времени гидролиза возрастает вероятность неспецифического расщепления пептидных связей, необходимо предельно ограничить время реакции.

2.3.3. Побочные реакции

Частичный кислотный гидролиз белка сопровождается рядом побочных реакций, таких, например, как дисульфидный обмен, образование дикетопиперазинов, циклизация N-концевого глутамина в пирролидонкарбоновую кислоту, α—β-миграция остатков аспарагиновой кислоты, гидролиз аспарагина и глутамина с образованием карбоновых кислот, частичная деструкция остатков триптофана.

Реакция дисульфидного обмена [уравнение (2.12)] идет в сильнокислой среде в основном по механизму, включающему образование сульфиний-ионов RS^+ [156, 212]. Фактически, при

$$R_1\text{—SS—}R_1 + R_2\text{—SS—}R_2 \rightleftarrows 2R_1\text{—SS—}R_2 \qquad (2.12)$$

гидролизе инсулина в концентрированной HCl получают избыточное количество цистинсодержащих пептидов (по сравнению с числом S—S-связей) [156]. Следовательно, реакция дисульфидного обмена при частичном кислотном гидролизе существенно усложняет задачу локализации дисульфидных связей.

Если при частичном гидролизе белка образуются дипептиды, вполне возможно, что они не будут соответствовать природному фрагменту из-за инверсии порядка аминокислот. Причиной инверсии является циклизация дипептидов в дикетопиперазины, легко протекающая в разбавленных кислотах при комнатной температуре [уравнение (2.13)]. Гидролиз этих

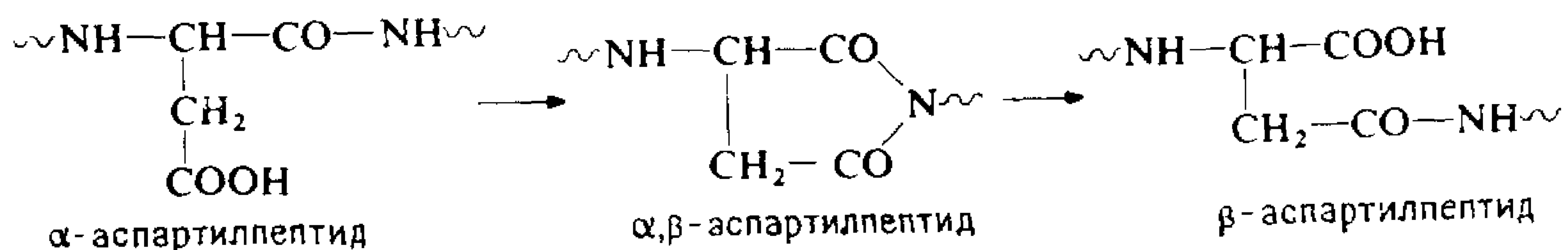
$$H_2N\text{—}CH(R_1)\text{—}CO\text{—}NH\text{—}CH(R_2)\text{—}COOH \underset{+H_2O}{\overset{-H_2O}{\rightleftarrows}} \text{цикло}[\text{—}CH(R_1)\text{—}CO\text{—}NH\text{—}CH(R_2)\text{—}CO\text{—}NH\text{—}] \xrightarrow{+H_2O} H_2NCH(R_2)CO\text{—}NHCH(R_1)COOH \qquad (2.13)$$

дипептид — дикетопиперазин

циклических соединений может привести как к исходному, так и к изомерному дипептиду с обращенной последовательностью аминокислот. Дикетопиперазины менее устойчивы в условиях кислотного гидролиза по сравнению с соответствующими дипептидами. Инверсия аминокислотной последовательности в 0,1 M HCl наглядно показана на примере глицилвалина [158].

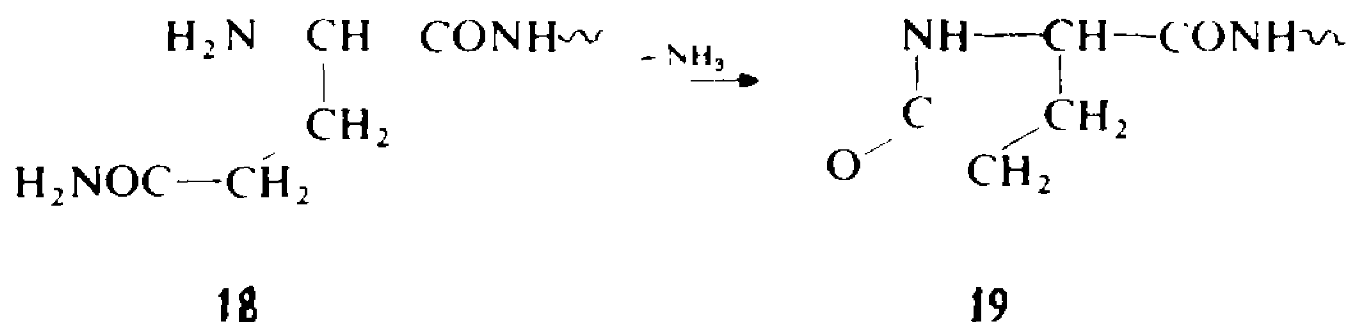
Реакция α,β-транспептидации остатка аспарагиновой кислоты идет в кислой среде через промежуточное образование сукцинимидного производного [уравнение (2.14)] [128, 185]. Образующееся β-аспартилпроизводное придает пептидной связи устойчивость к гидролизу экзопептидазами, например лейцина-

минопептидазой и карбоксипептидазами. Более того, β-аспартилимид блокирует секвенирование по Эдману на стадии циклизации.



(2.14)

В достаточно мягких условиях идет циклизация N-концевого остатка глутамина (18) в пирролидонкарбоновую кислоту (19)



[77, 177]. Поэтому пептиды с N-концевым глутамином дают отрицательную реакцию с нингидрином и не могут быть секвенированы. Аналогичным образом может циклизоваться остаток глутаминовой кислоты, но в более жестких условиях. Относительно отщепления N-концевой пирролидонкарбоновой кислоты см. разд. 1.6.1.

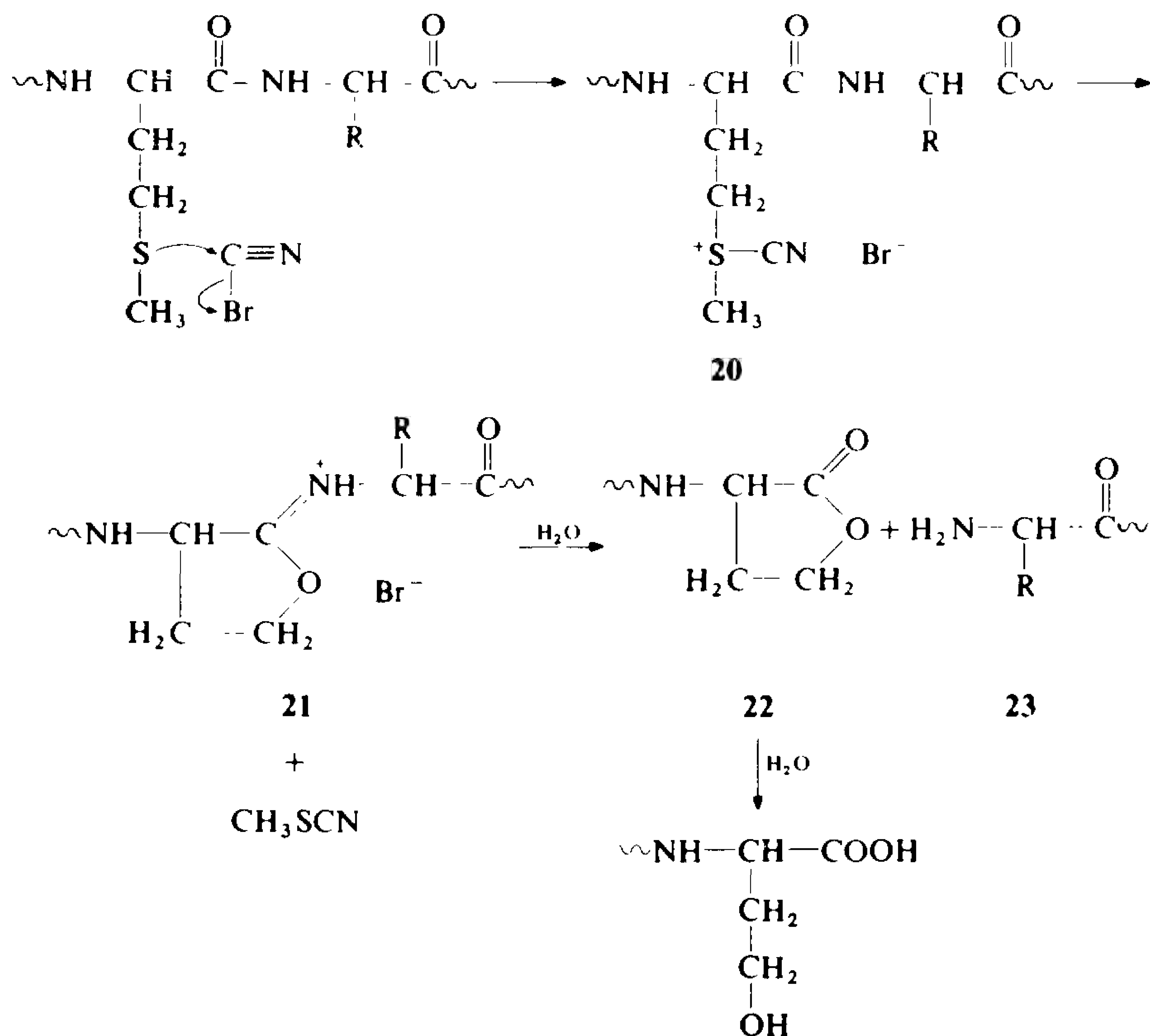
2.4. Расщепление по остатку метионина

2.4.1. Бромоциан

Расщепление пептидной связи по карбоксильной группе метионина основано на взаимодействии бромоциана с тиоэфирной группой с образованием гомосерина, гомосеринлактона и метилтиоцианата [68].

Цианогруппа реагента электрофильно атакует атом серы, образуя промежуточную цианосульфониевую соль (20). Нуклеофильная атака кислородом карбонильной группы метионина γ-углеродного атома цианосульфониевой соли приводит к освобождению метилтиоцианата и образованию иминолактона (21). Промежуточный иминолактон гидролизуется с образованием пептидилгомосеринлактона (22) и соответствующего пептидилгомосерина, а также «аминопептида» (23) [67—69].

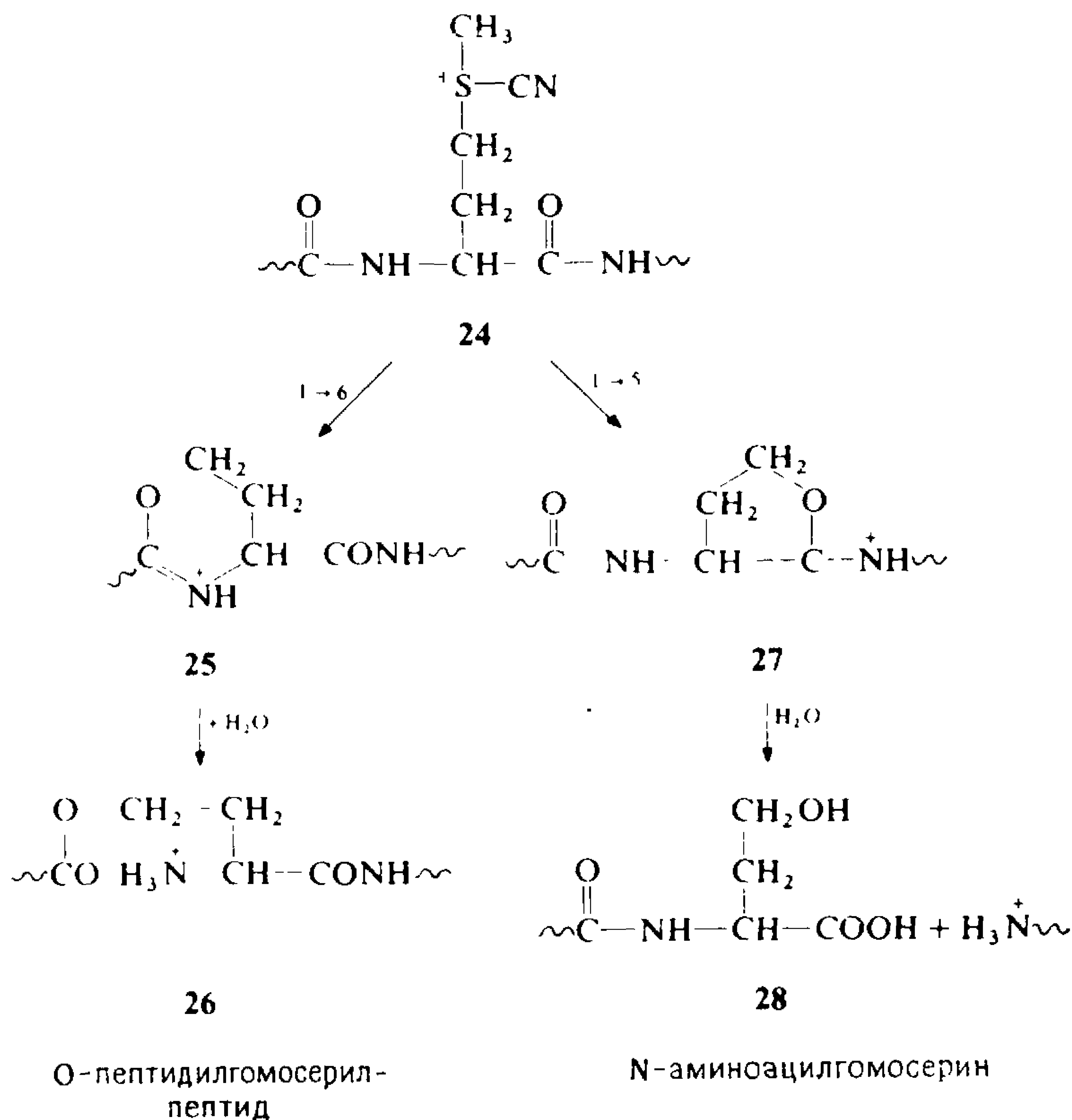
После первоначального успешного применения бромоциана при исследовании рибонуклеазы [69] эта реакция получила самое широкое применение [67, 181]. В оптимальных условиях бромоциан расщепляет пептидную связь метионина многих



белков, причем часто с количественным выходом. Наиболее длинный полипептид, который удалось расщепить с помощью бромоциана, β-галактозидаза *E. coli*, включающая 1021 аминокислотный остаток [55]. Метод удобен в практическом отношении, поскольку реагент и побочные продукты реакции летучи и легко удаляются при лиофилизации. Поскольку метионин принадлежит к относительно редким аминокислотам, реакция расщепления бромоцианом позволяет получить крупные фрагменты, которые удобны как объекты для автоматического секвенирования.

Все получаемые фрагменты имеют на С-конце гомосеринлактон, исключение составляет С-концевой пептид белка. При аминокислотном анализе гомосеринлактон элюируется в области основных аминокислот, обычно между аммиаком и аргинином. Гомосерин элюируется вместе с глутаминовой кислотой, однако известны условия, позволяющие элюировать их раздельно [67]. Гомосеринлактон гидролизуют в гомосерин путем обработки 0,1 *М* NaOH в течение 1 ч [172] или в буфере пиридин — уксусная кислота (pH 6,5) при 105 °C в течение 1 ч [2].

По данным количественного определения гомосерина [67] и метилтиоцианата [90] можно сделать ошибочный вывод

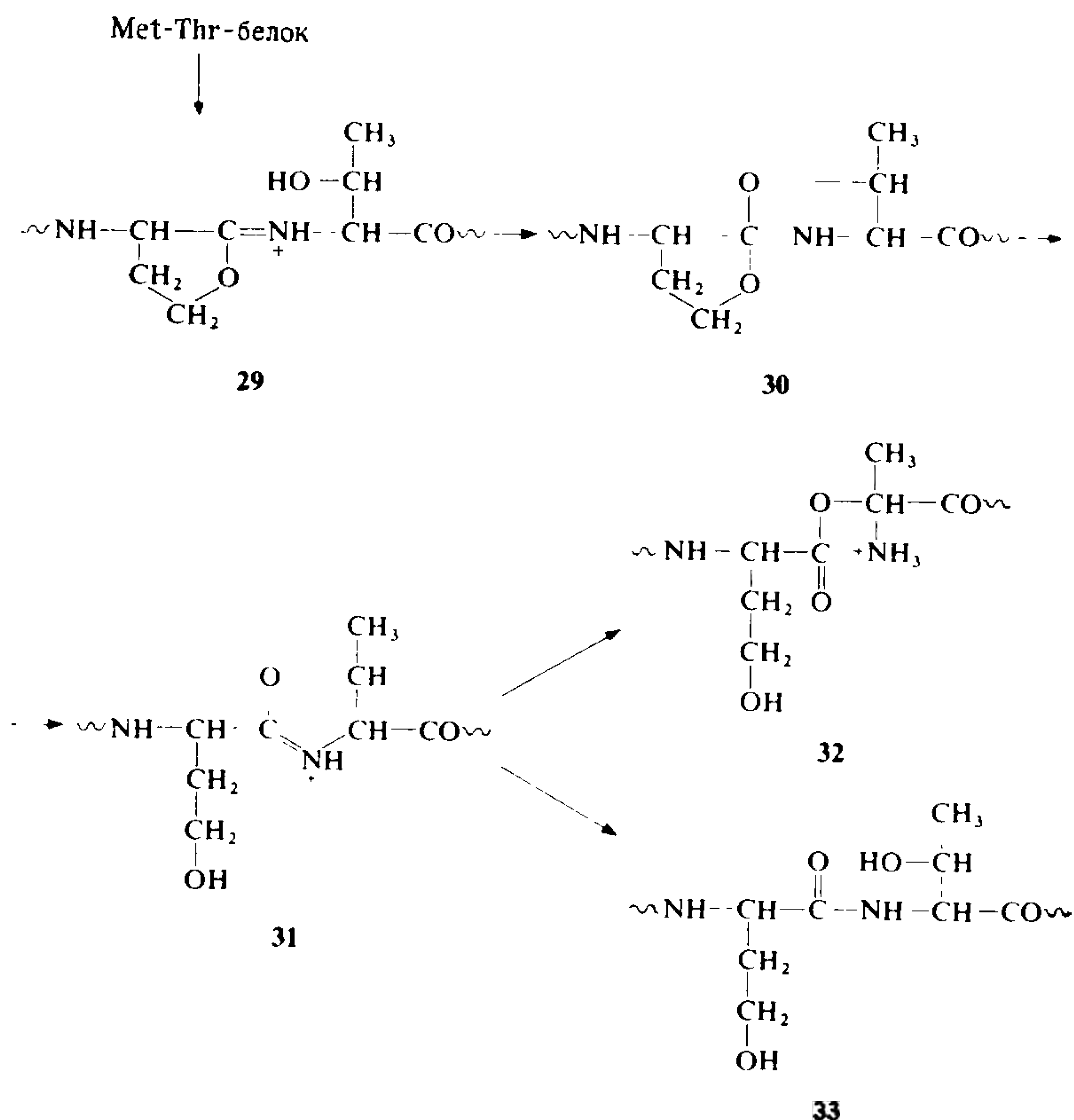


относительно степени прохождения реакции расщепления. Показано, что гомосерин может образоваться совсем по иному механизму, без расщепления связей метионина. Принято считать, что побочная реакция идет через образование шестичленного цикла (**25**→**26**) и может конкурировать с реакцией образования пятичленного иминолактона (**27**→**28**) [22].

После нейтрализации реакционной среды О-пептидилгруппа мигрирует к атому азота гомосерина (разд. 2.3.2). Степень протекания этой побочной реакции, по всей видимости, варьирует в зависимости от природы двух аминокислотных остатков, граничащих с метионином.

В ряде случаев низкий выход реакции расщепления бромоцианом объясняется присутствием наиболее устойчивых фрагментов Met-Thr или Met-Ser [167, 191], причем промежуточный иминолактон атакуется соседним гидроксилом треонина или серина с образованием гомосерил-О-треонил- или гомосерил-О-серилпептидов (**29**→**33**); бициклическая структура (**30**) распа-

дается с образованием боковой цепи гомосерина (31) и с раскрытием цикла, давая соединения (32) или (33) со сложноэфирной или пептидной связью соответственно.



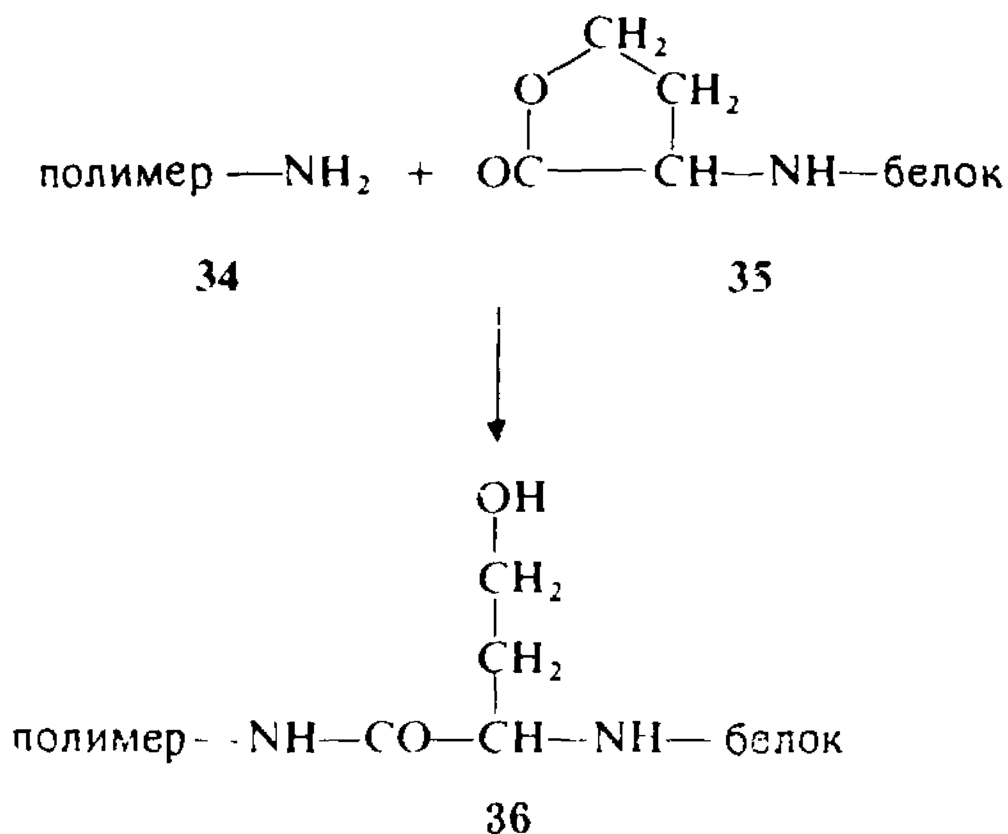
Показано, что расщепление фрагментов Met-Thr или Met-Ser целесообразно проводить в водной трифтороуксусной кислоте (ТФУ). Как сильная кислота ТФУ может препятствовать протеканию побочной реакции благодаря протонированию гидроксильных групп и иминолактона [167, 191].

Пептидные связи метионин-S-оксида и метионин-S,S-диоксида не расщепляются бромцианом [67]. Недавно появилось сообщение [51] о том, что при большом избытке (1000 экв.) бромциана в 70%-ной муравьиной кислоте метионин окисляется до метионин-S-оксида. Это наблюдение позволяет объяснить устойчивость пептидных связей метионина при большом избытке реагента [134, 135]. Известно, что в присутствии бромциана идет окисление цистеина до цистина [56] и с меньшей

скоростью до цистеиновой кислоты [67]. Кроме того, при избытке бромоциана идет бромирование остатков тирозина [51] и расщепление пептидной связи триптофана (разд. 2.4.2).

Реакцию проводят в 0,1 М соляной, водных муравьиной или трифтороуксусной кислоте. В настоящее время как растворитель наиболее часто применяют 70%-ную муравьиную кислоту. В кислой среде ε-аминогруппы и другие основные группировки находятся в протонированной форме, благодаря чему исключается их взаимодействие с бромоцианом. Кроме того, в водной муравьиной кислоте как сильном денатурирующем агенте остатки метионина становятся более «экспонированными», т. е. более доступными для реагента.

Реакция с бромоцианом находит и иное применение. Пептидные фрагменты, полученные при расщеплении бромоцианом и несущие С-концевой гомосеринлактон, можно вводить в реакцию конденсации (с высоким выходом) с аминогруппами полимеров (**34**→**36**). Этот метод позволяет избирательно фиксировать фрагменты через С-концевой аминокислотный остаток на нерастворимом носителе с целью твердофазного секвенирования [86].



Полагают, что фрагменты 1—65 и 66—104 цитохрома *c* сердца лошади, полученные расщеплением бромоцианом в водной среде, способны к самосборке с реконструкцией пептидной связи [34]. Аналогичным образом самопроизвольно происходит конденсация фрагментов (1—52 и 53—58) панкреатического ингибитора трипсина [41]. Иными словами, циклическая структура С-концевого гомосеринлактона находится в достаточно активированном состоянии, чтобы в мягких условиях вступать в реакцию аминолиза с α-аминогруппой N-концевой аминокислоты. Благодаря этому удается осуществить синтез цитохрома *c* и трипсинового ингибитора из соответствующих фрагмен-

тов [173]. Другая область применения реакции метионина с бромоцианом удивительным образом связана с генноинженерным синтезом некоторых гормонов. С помощью этой реакции ведут расщепление гибридного белка «гал-Met-соматотропина» из *E. coli* с образованием белка-носителя β-галактозидазы и целевого тетрадекапептида соматотропина [93].

2.4.1.1. Методика. Навеску белка растворяют (10—20 мг/мл) в 70%-ной муравьиной кислоте и добавляют твердый бромоциан (2 мг/мг белка или 20—100-мольный избыток в расчете на метионин). Инкубацию ведут при комнатной температуре без доступа света в течение 18—20 ч. По завершении реакции реакционную смесь разбавляют 5—10 объемами воды и высушивают лиофильно. Продукты реакции разделяют гель-фильтрацией. Продолжительность реакции может быть существенно меньше. Например, 0,5 мкмоль пептида/мл обрабатывали бромоцианом (5 мг/мл) при комнатной температуре в течение 4 ч [101, 200].

2.4.2. Другие реагенты

Расщепить пептиды по остатку метионина можно с помощью агентов, алкилирующих тиоэфирную группу по механизму реакции, аналогичному расщеплению бромоцианом. Наиболее эффективным реагентом оказался иодоацетамид [109, 110]. При обработке апокаталазы этиленимином идет реакция присоединения по тиоэфирной группе метионина с образованием аминоэтилсульфониевой соли с последующим расщеплением пептидной связи [166]. В сочетании с методом диагонального электрофореза эту реакцию применяли для идентификации и выделения пептидов, содержащих остатки метионина [187, 188].

На модельных пептидах показано, что расщепление по метионину идет с высоким выходом под действием фтороводорода [112, 133]. Реакция сопровождается N→O-ацильной миграцией по остаткам серина и треонина (разд. 2.3.2). Из-за этой побочной реакции метод расщепления с помощью HF не находит применения в химии белка.

2.5. Расщепление по остатку триптофана

Метод селективного расщепления пептидных связей остатка триптофана основан на высокой реакционной способности индольного ядра. При этом благодаря низкому содержанию в белках триптофана должны образоваться несколько крупных фрагментов, удобных для секвенирования. Однако, несмотря на то что за годы поисков были найдены подходящие реагенты и методики, лишь немногие из них нашли практическое применение [47, 181]. Далее подробно рассматриваются наиболее полезные и часто применяемые на практике методики. Относительно остальных методов расщепления по триптофану будут сделаны лишь короткие комментарии.

2.5.1. Окислительное галогенирование

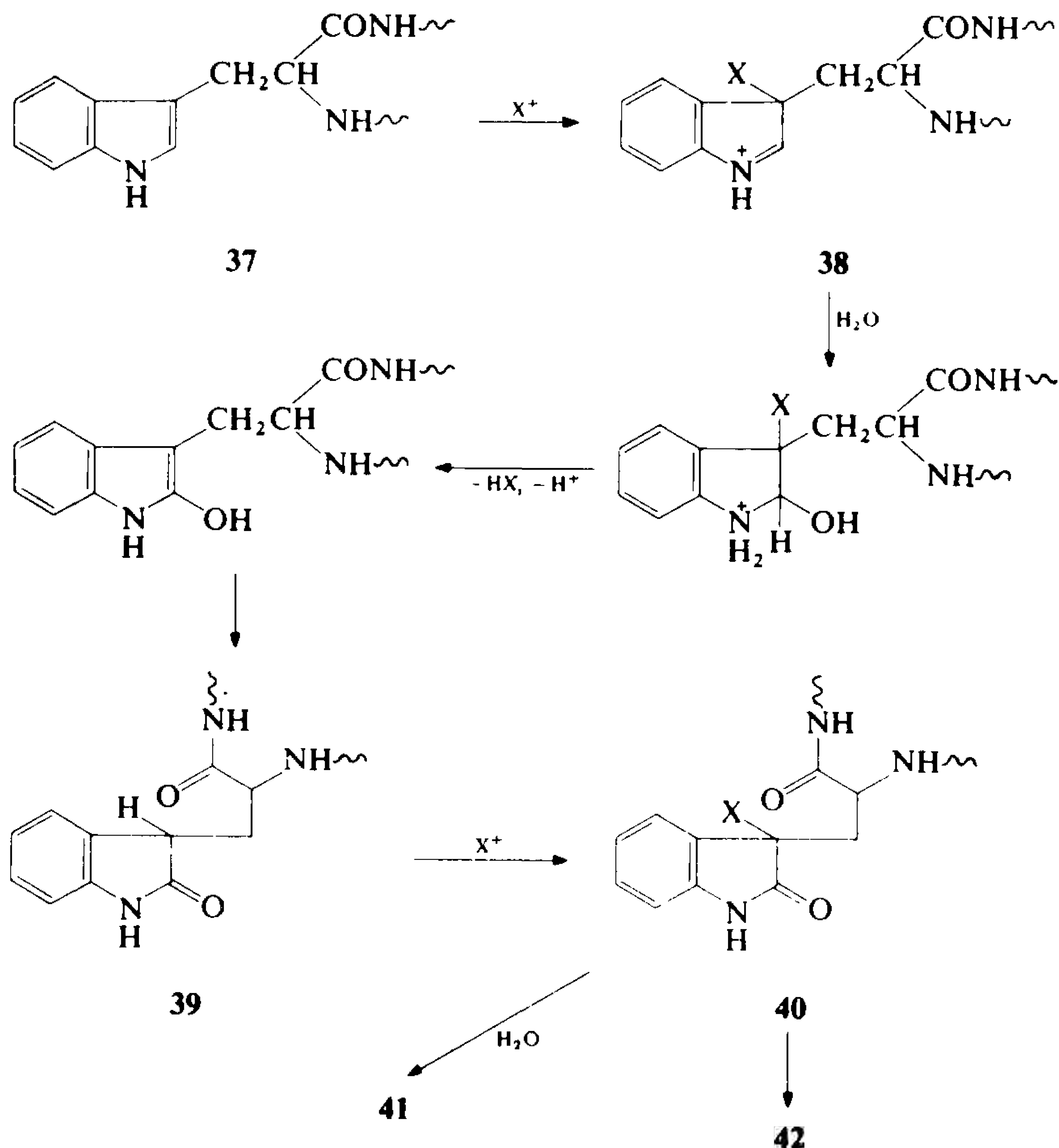
Окислительное галогенирование индольного ядра остатка триптофана N-бромосукцинимидом (NBS) было впервые предложено как метод модификации и расщепления триптофилпептидной связи. Из других бромирующих агентов, которые использовались для этих целей, следует упомянуть N-бромоацетамид, N-бромофталимид и бром [47, 137, 148, 181, 209].

Главный недостаток расщепления белков по карбоксильной группе триптофана с помощью бромосукцинимида заключается в низком выходе фрагментов, который редко превышает 50%, а иногда составляет даже 5%. Кроме того, расщепление по триптофану сопровождается побочными реакциями. На практике благодаря высокой реакционной способности N-бромосукцинимида может идти модификация и расщепление пептидных связей не только остатков триптофана, но и остатков тирозина (разд. 2.6.1) и гистидина (разд. 2.8.3). Однако расщепление по тирозину можно исключить путем О-ацилирования фенольного гидроксила [169—171]. Расщепление по гистидину также можно свести к минимуму, поскольку эта реакция идет только при нагревании. В ходе реакции метионин в значительной степени окисляется до метионин-S,S-диоксида, а цистеин и цистин до цистеиновой кислоты. В 8 М мочевине N-бромосукцинимид расщепляет только связи триптофана, в то время как тирозин не затрагивается [64]. Из-за недостатков, свойственных методу с применением N-бромосукцинимида, была изучена возможность применения других галогенирующих реагентов.

Расщепление с помощью N-бромосукцинимида проводят в кислой среде при достаточном избытке реагента в расчете на серусодержащие аминокислоты, тирозин и гистидин. При расщеплении простых триптофансодержащих пептидов на 1 моль пептида в реакции расходуется 2—3 моля N-бромосукцинимида. Исследование взаимодействия бромосукцинимида с 3-индолами и простыми производными триптофана [209], а также строения некоторых промежуточных продуктов реакции [51, 162, 163] позволило предложить наиболее вероятный механизм расщепления связи по триптофану через окислительное галогенирование (см. последовательность реакций **37**→**43**).

Как следует из предлагаемой схемы реакций, в превращениях участвуют 2 экв. электрофильного галогена. Благодаря своей высокой реакционной способности N-бромосукцинимид галогенирует бензольное кольцо тирозина в положение *5* [137]. По-видимому, первым промежуточным продуктом реакции является 3-галогеноиндоленин (**38**), который затем в результате гидролиза и элиминирования переходит в оксоиндол (**39**). Далее оксоиндол (**39**) при взаимодействии со вторым эквивален-

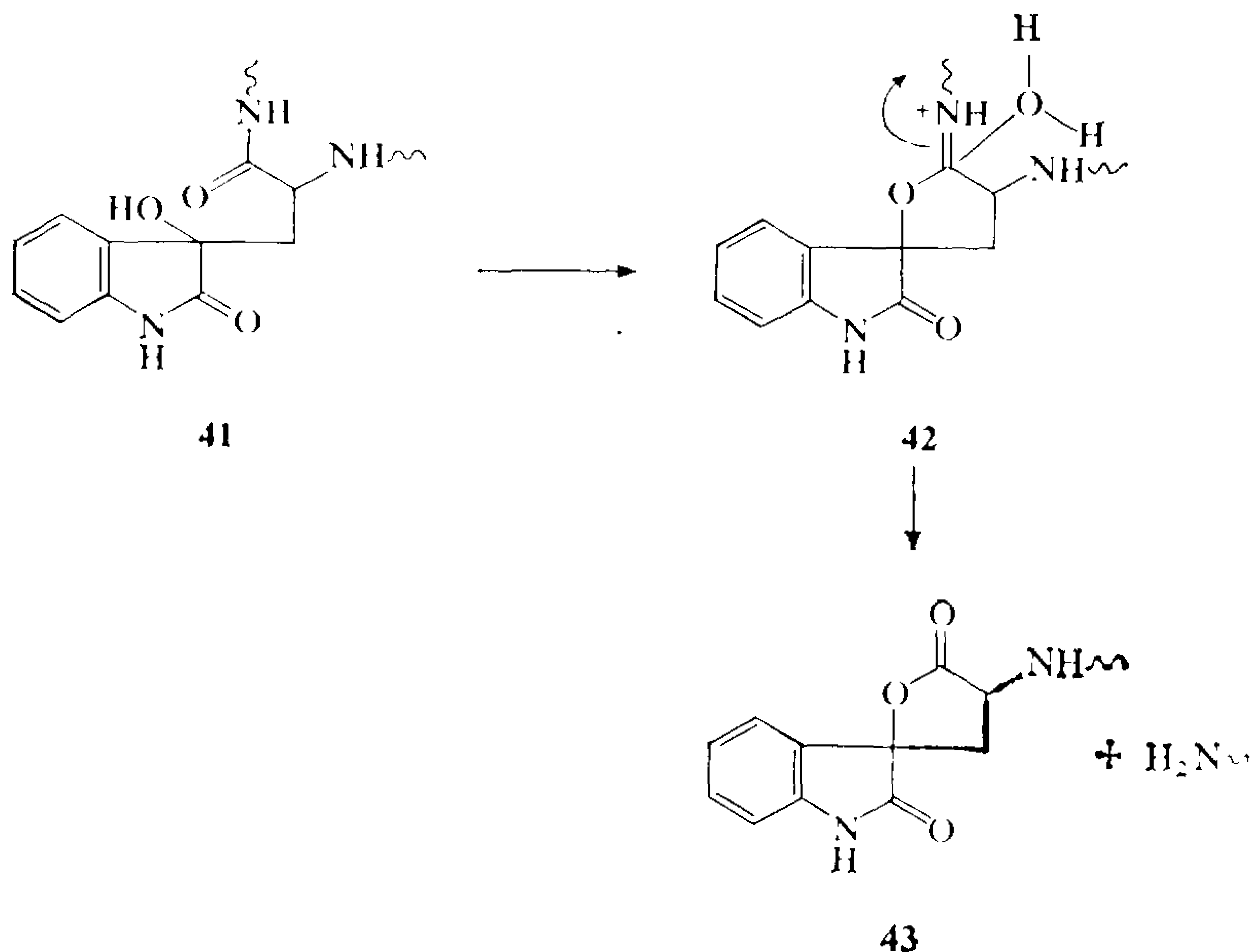
том положительно заряженного галогена превращается в 3-галогенооксоиндол (**40**), который благодаря нуклеофильной атаке кислорода карбоксильной группы триптофана по углеродному атому (индольного ядра), связанному с галогеном, превращается в иминолактон (**42**). Последний легко гидролизуется в N-ацилдиоксоиндолилаланинлактон (**43**) (находящийся в равновесии с открытой формой аминокислоты), который становится С-концевым аминокислотным остатком пептидного фрагмента.



Факт, что оксоиндол является промежуточным соединением в последовательности реакций расщепления, был четко показан на примере цитохрома *c* сердца лошади [51, 163]. Единственный в белке остаток триптофана вначале избирательно окисляли в производное оксоиндола, а затем проводили бромирование в системе HBr — ДМСО.

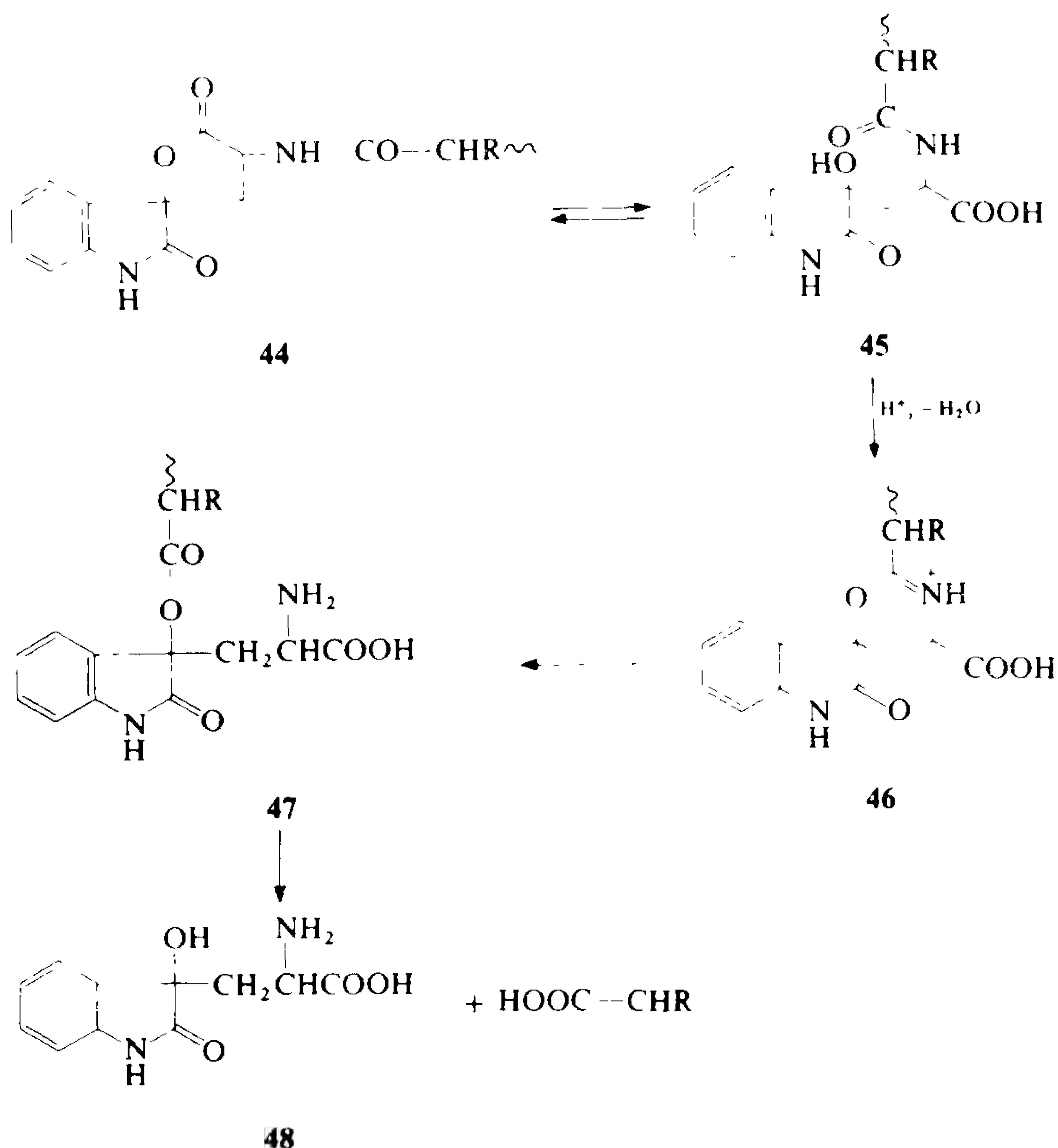
Последовательность реакций (**37**→**43**) включает также еще

один путь, согласно которому 3-галогенооксоиндолилаланин (**40**) наряду с циклизацией до **42** гидролизуется в диоксоиндолилаланин (**41**). Избирательное (или предпочтительное) расщепление пептидных связей по диоксоиндолилаланину может быть достигнуто мягким кислотным гидролизом [162]. Выдвинутое в работе [20] предположение об анхимерном содействии γ-гидроксигруппы катализируемому кислотами гидролизу алифатических амидов убедительно подтверждается легкостью и селективностью гидролиза пептидной связи в токсичном циклопептиде фаллоидине, при котором γ-гидроксигруппа способствует расщеплению пептидной связи [204, 205].



Установлено также, что расщепление пептидной связи при окислительном галогенировании может идти и по аминогруппе остатка триптофана, хотя и с низким выходом [123, 162, 163]. Если глицилтриптофан инкубируют с BNPS-скатолом (разд. 2.5.2) в 75%-ной уксусной кислоте при 37 °С в течение 24 ч, с выходом 20% образуется свободный глицин [123]. При расщеплении пентапептида Phe-Val-Gln-Trp-Leu в системе ДМСО — галогеноводород в уксусной кислоте и последующем подкислении до pH 2 (60 °С, несколько часов) кроме ожидаемого остатка лейцина в смеси идентифицируют свободный диоксоиндолилаланин (и/или его лактон). На кривой элюирования с аминокислотного хроматографа не было обнаружено других аминокислот [163].

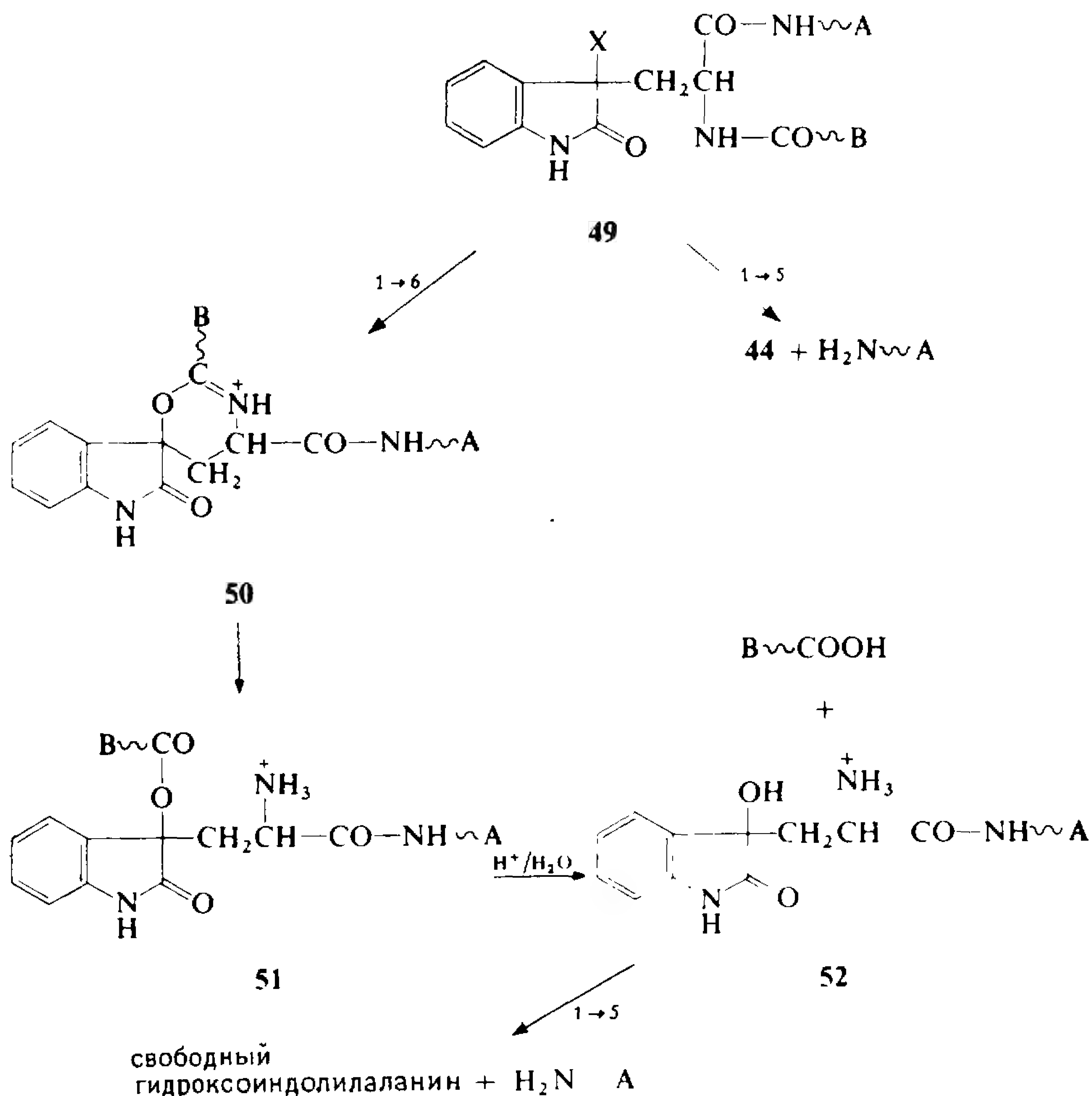
Расщепление по аминогруппе триптофана можно представить в виде последовательности реакций 44→48, в которой в результате расщепления С-пептидной связи триптофана по механизму окислительного галогенирования образуется фрагмент с С-концевым оксиндолилаланином (44), который затем



через промежуточный 6-членный интермедиат иминолактона (46) превращается в 48.

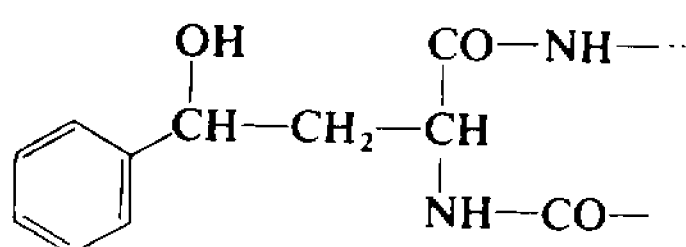
Расщепление пептидной связи по аминогруппе триптофана можно также объяснить 1—6-взаимодействием по аналогии с механизмом реакции бромоциана с метионином без расщепления пептидной связи [22] (разд. 2.4.1). В случае метионина образуется производное О-аминоацилгомосерина, которое, по-видимому, устойчиво в водной среде (например, в 70%-ной муравьиной кислоте). В случае триптофансодержащих пептидов идет образование соответствующего О-аминоацильного произ-

водного с группой третичного алкилового эфира (**51**), который, полагают, гораздо более лабилен в кислой среде. Возможный механизм 1—6-взаимодействия представлен последовательностью реакций **49→52**.

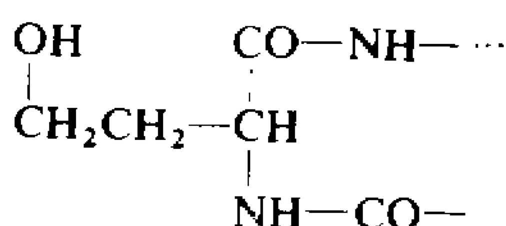


В этой связи интересно отметить, что имеются сведения [196] о расщеплении в условиях мягкого гидролиза по аминогруппе и карбоксилу γ-фенилгомосерилпептидов (**53**), близких в структурном отношении как гомосерину (**54**), так и пептидам с диоксоиндолилаланином (**55**). Пептиды с N-концевым триптофаном не расщепляются галогенирующими реагентами [181]. Возможно, что с бромоиндоленином (**37**) преимущественно взаимодействует не карбоксиамидная группировка, а α-аминогруппа триптофана с образованием трициклического производного, что исключает расщепление пептидных связей [131]. Подобное участие в реакции свободной аминогруппы было

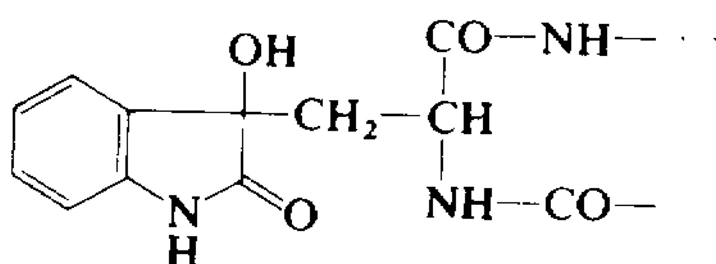
обнаружено в случае N-тирозилпептидов, которые также не расщепляются N-бромосукцинимидом [208] (разд. 2.6).



53



54



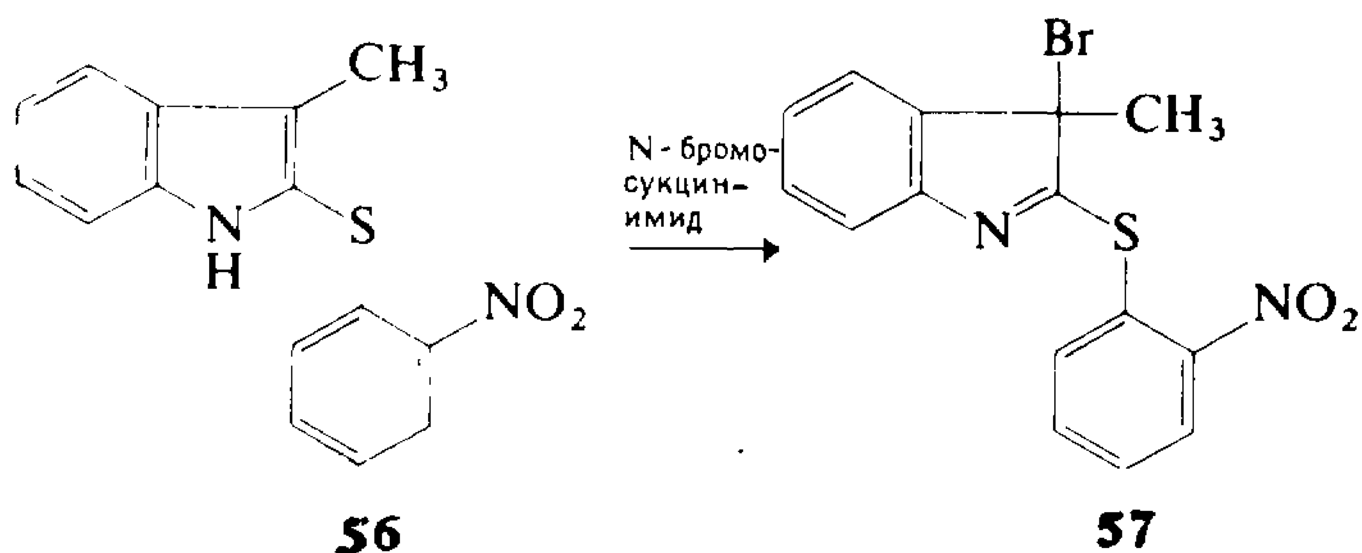
55

УФ-спектры пептидных фрагментов, полученных окислительным галогенированием, свидетельствуют о присутствии в молекуле С-концевого диоксоиндолилаланина или его лактона (последовательность 37→43). Диоксоиндолилаланин в воде характеризуется $\lambda_{max}=253$ нм ($\varepsilon=4070$), $\lambda_{max}=287$ нм ($\varepsilon=1220$) ($\lambda_{min}=230$ и 277 нм). Соответствующий лактон имеет аналогичный максимум поглощения при 253 и 300 нм [66, 161, 163]. При проведении реакции с N-бромосукцинимидом или другими галогенирующими агентами образуются 5-бромодиоксоиндолилаланин ($\lambda_{max}=261$ и 302 нм) и/или его лактон ($\lambda_{max}=261$ и 310 нм) [76, 123]. УФ-спектр оксоиндолилаланина не имеет λ_{max} в области 270—300 нм и характеризуется λ_{min} при 250 нм и плечом при ~280 нм. Если пептидные фрагменты содержат другие хромофорные группы (например, тирозин), УФ-спектр в области 250—300 нм изменится.

Следует иметь в виду, что расщепление пептидной связи тирозина окислительным галогенированием обычно проводят в 50—80%-ной уксусной (или муравьиной) кислоте при комнатной температуре в течение нескольких часов по аналогии с расщеплением бромоцианом (разд. 2.4.1). Это довольно жесткие условия, при которых возможны побочные реакции, такие, как дезамидирование или расщепление лабильных пептидных связей (Asp-Pro). Фрагменты с С-концевым диоксоиндолилспиролактоном фиксируют ковалентно через 3-аминопропильную группу макропористого стекла с целью твердофазного секвенирования по Эдману [197].

2.5.2. Расщепление с помощью BNPS-скатола

В настоящее время для расщепления пептидов и белков по остатку триптофана применяют главным образом 2-(2-нитрофенилсульфенил)3-бромо-3-метилиндоленин (57) (BNPS-скатол) [45, 50, 132]. Реактив готовят путем бромирования 2-(2-нитрофенилсульфенил)3-метилиндола (56) N-бромосукцинимидом в ледяной уксусной кислоте [132]. В работе [211] предложен модифицированный метод получения BNPS-скатола и спектроскопически подтверждена его «индолениновая» структура.



BNPS-скатол действует более избирательно по сравнению с N-бромосукцинимидом. После обработки смеси аминокислот BNPS-скатолом (10 экв.) в 50%-ной уксусной кислоте при комнатной температуре в течение 30 мин в реакционной смеси полностью исчезает триптофан, метионин превращается в метионин-S-оксид, а остальные аминокислоты обнаруживаются в гидролизате количественно. Напротив, при аналогичной обработке N-бромосукцинимидом в гидролизате отсутствует не только триптофан, но и метионин, тирозин, гистидин, цистин. Как и следовало ожидать, цистеин легко окисляется BNPS-скатолом до цистина, а при избытке реагента — частично до цистеиновой кислоты. При наличии в белке SH-групп их предварительно защищают, используя подходящий реагент [132].

Как было убедительно показано на примере нуклеазы [132], для расщепления по триптофану необходима продолжительная инкубация в присутствии избытка реагента (20—100-кратного). При сокращении времени и небольшом избытке реагента можно обнаружить лишь частичную модификацию триптофана.

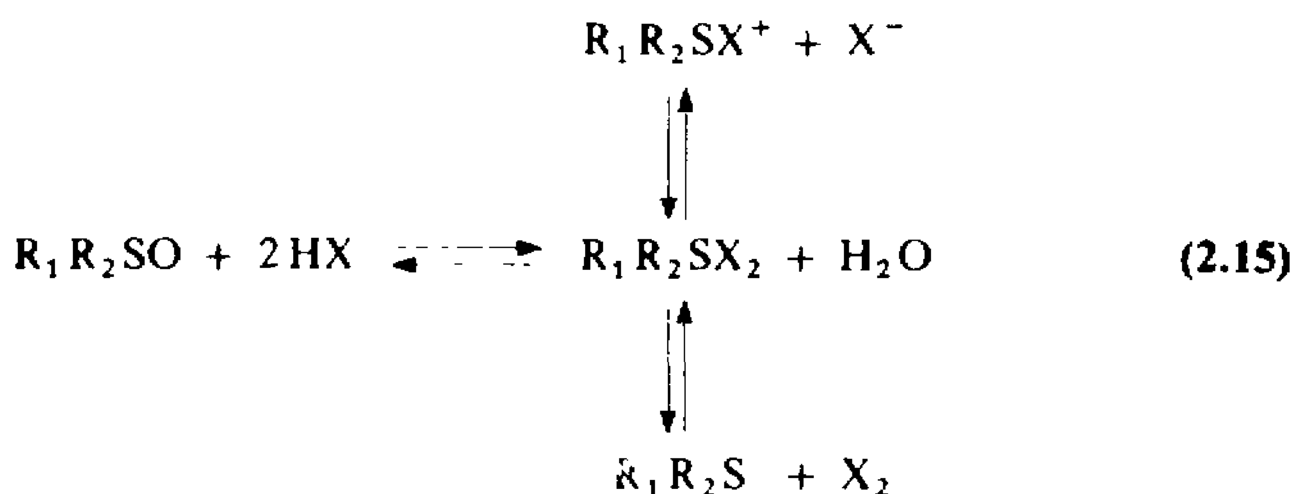
Известны многочисленные работы по применению BNPS-скатола в химии белка [51]. Выход продуктов избирательного расщепления по триптофану составляет 40—80%. По-видимому, выход зависит от качества реагента. BNPS-скатол чувствителен к действию света, разлагается при комнатной температуре, темнеет и выделяет бром. В то же время высокоочищен-

ные кристаллические препараты (бледно-желтые звездочки при кристаллизации из лигроина [132]) могут храниться в герметичной упаковке при —20 °C достаточно долго.

2.5.2.1. Методика [123]. Пептид 89—169 основного белка бычьего миелина (1—7 мкмоль/мл) инкубируют с BNPS-скатолом (17 мкмоль/мл) в 75%-ной уксусной кислоте при 37 °C в течение 24 ч. Затем избыток реагента и побочные продукты реакции отделяют повторной экстракцией этилацетатом, водный слой высушивают лиофильно. Очистку пептидных фрагментов ведут с помощью гель-фильтрации.

2.5.3. Расщепление по остатку триптофана в системе ДМСО — галогеноводородные кислоты

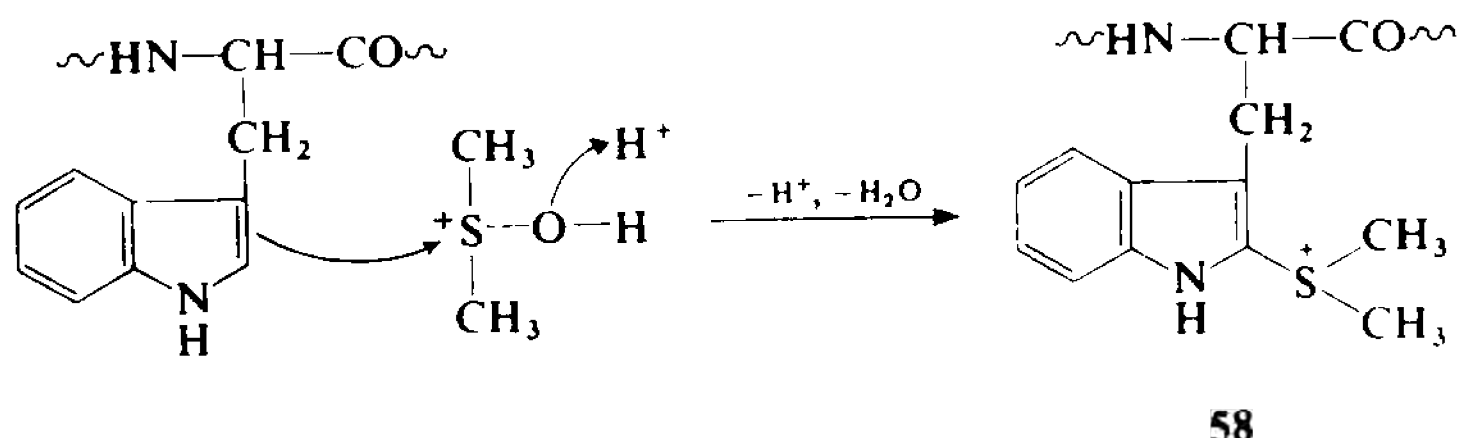
Триптофансодержащие белки и пептиды можно расщепить избирательно смесью ДМСО и бромоводородной кислоты в уксусной кислоте. По выходу продуктов реакции этот метод сопоставим с расщеплением BNPS-скатолом, однако превосходит его по доступности реагентов и простоте реализации [51, 163]. Механизм реакции заключается в окислительном галогенировании индольного ядра триптофана. Фактически при взаимодействии сульфоксида и галогеноводородной кислоты имеют место несколько равновесных реакций [уравнение (2.15)] с образова-



нием в качестве главного промежуточного продукта галогеносульфониевого иона $R_1R_2SX^+$ [14]. Галогенирование индольного ядра триптофана могут осуществлять все три промежуточные соединения: дигалогенид сульфида, галогенид галогеносульфония и свободный галоген.

В то время как в смеси ДМСО — HCl однозначно идет превращение триптофана в оксоиндолилаланин [162, 164], в ДМСО — HBr триптофан окисляется до диоксоиндолилаланина с одновременным образованием спиролактона [51]. Триптофансодержащие пептиды также окисляются смесью ДМСО — HBr до диоксоиндолилаланина, и только в этом случае окисление сопровождается расщеплением пептидной связи. Показано также, что оксоиндолилаланинпептиды, полученные при обработке смесью ДМСО—HCl, могут быть расщеплены при

последующей обработке смесью ДМСО—HBr. Этот факт свидетельствует об образовании в качестве промежуточного продукта реакции оксоиндола [162—164]. Для достижения оптимального выхода продуктов реакции рекомендуется проводить последовательную обработку белков смесями ДМСО — HCl, а затем ДМСО — HBr in situ. Непосредственное взаимодействие триптофансодержащих пептидов с ДМСО — HBr приводит к образованию в качестве промежуточного продукта 2-диметилсульфонийтриптофана (58). По-видимому, образование такого соединения происходит в результате электрофильного замещения в положении *2* индольного ядра триптофана протонированным ДМСО по аналогии с реакцией, наблюдающейся в ряду фенолов и их эфиров [63].



Реакция расщепления под действием смеси ДМСО — галогеноводородная кислота идет избирательно по пептидной связи триптофана. При этом метионин окисляется до S-оксида, а цистеин — до цистина. На практике с целью защиты остатка тирозина в реакционную смесь добавляют немного фенола. Рекомендуется добавлять фенол и в 48%-ную HBr для связывания следов брома. Указанных мер вполне достаточно для полного сохранения тирозина [163], однако известно одно исключение, когда отмечалась его деструкция [57].

2.5.3.1. Расщепление по остатку триптофана путем обработки смесями ДМСО — HCl и ДМСО — HBr [163]. Цитохром *с* (17 мг) и 20 мг фенола растворяют при 20 °С в смеси следующего состава: ледяная уксусная кислота (600 мкл)+12 М HCl (300 мкл), ДМСО (12 мкл). Спустя 30 мин в реакционную смесь добавляют 48%-ную HBr (100 мл) и ДМСО (25 мкл) и инкубируют при 20 °С в течение 30 мин. Затем прибавляют 2 мл воды и несколько раз экстрагируют этилацетатом (для удаления гема и продуктов его деструкции). Водную фазу частично упаривают в вакууме, остаток хроматографируют в 10%-ной муравьиной кислоте на колонке (2×14 см) с сефадексом G-50 (супермелкий). Пептидные фрагменты цитохрома *с* элюируются в виде трех фракций. Первая фракция, которой предшествуют следы агрегированного белка, содержат апоцитохром *с* с модифицированным (в виде диоксоиндолилаланина) триптофаном-59. Вторая и третья фракции содержат соответственно фрагменты 1—59 и 60—104 (выход, ~60%, продуктов реакции определяют по результатам взвешивания после лиофилизации).

Фрагменты идентифицируют по аминокислотному составу гидролизата после гидролиза 3 М *п*-толуолсульфокислотой [117]. Выход аминокислот по результатам анализа соответствовал составу апоцитохрома *с* и его фрагмен-

тов. Остатки метионина в положении *65* и *80* были окислены до метионин-S-оксида. Под действием реагента происходило полное отделение гема по аналогии с действием на цитохром *с* BNPS-скатола [50].

2.5.3.2. Расщепление по остатку триптофана под действием ДМСО — HCl и BrCN [83]. Предварительно восстанавливают и алкилируют присутствующие в белке остатки цистина (цистеина). Для этой цели используют реагенты обычной классификации. Небольшое количество раствора образца, содержащего 2—3 нмоль белка, помещают в микропробирку объемом 1,5 мл от центрифуги Эппендорф и высушивают лиофильно. К сухому остатку прибавляют 4,9 мкл свежеприготовленного реагента (300 мкл ледяной уксусной кислоты+150 мкл 9 М HCl+40 мкл ДМСО) и инкубируют при 20 °С в течение 30 мин или при 4 °С в течение 2 ч. Затем реакционную смесь охлаждают на ледяной бане, добавляют 4,4 мкл охлажденного во льду 15 М (продажного) NH_4OH (при этом возможно появление осадка белка) и 40 мкл раствора бромоциана (0,3 г/мл) в 5 М уксусной или 60%-ной муравьиной кислоте. Пробирку плотно закрывают и герметизируют с помощью пленки парафильм. Реакционную смесь инкубируют при 20 °С без доступа света в течение 12—15 ч или при 4 °С в течение 30 ч.

Расщепление по триптофану проходит почти количественно независимо от строения соседних аминокислот. Реакция не сопровождается расщеплением или модификацией других аминокислот. Проведению реакции не мешает присутствие небольших количеств солей, ионных детергентов или кумасси голубого.

2.5.4. Расщепление по остатку триптофана бромоцианом в гептафтормасляной кислоте

Взаимодействие бромоциана с остатком триптофана в белках может привести к расщеплению пептидной связи с участием карбоксильной группы. Умеренный выход продуктов реакции (~20%) наблюдался в случае β-лактоглобулина [17] и глутаматдегидрогеназы *Neurospora crassa* [210]. Было показано [134—136], что выход продуктов реакции возрастает при использовании большого избытка реагента (10 000 моль/моль белка) и более высокой кислотности среды (что достигается заменой продажной 70%-ной муравьиной кислоты на гептафтормасляную).

Недавно показано [51], что механизм реакции заключается в окислительном галогенировании ядра триптофана. Модельное соединение N-ацетилтриптофанамид под действием избытка бромоциана превращается в N-ацетил-5-бромодиоксоиндолиллактон (образуются также другие продукты), находящийся в равновесии с его открытой формой (аналогично реакции с N-бромосукцинимидом) [137]. В условиях проведения реакции идет частичное бромирование свободного тирозина с образованием бромотирозина и окисление свободного метионина до метионин-S-оксида. Полагают [51], что в присутствии кислоты нуклеофил (индолил, фенол или тиоэфир) атакует атом брома полярной молекулы «псевдогалогена» CNBr с образованием

HCN и соответствующего бромпроизводного, который в конечном счете перегруппировывается в другие соединения (окси- и диоксоиндол, сульфоксид):



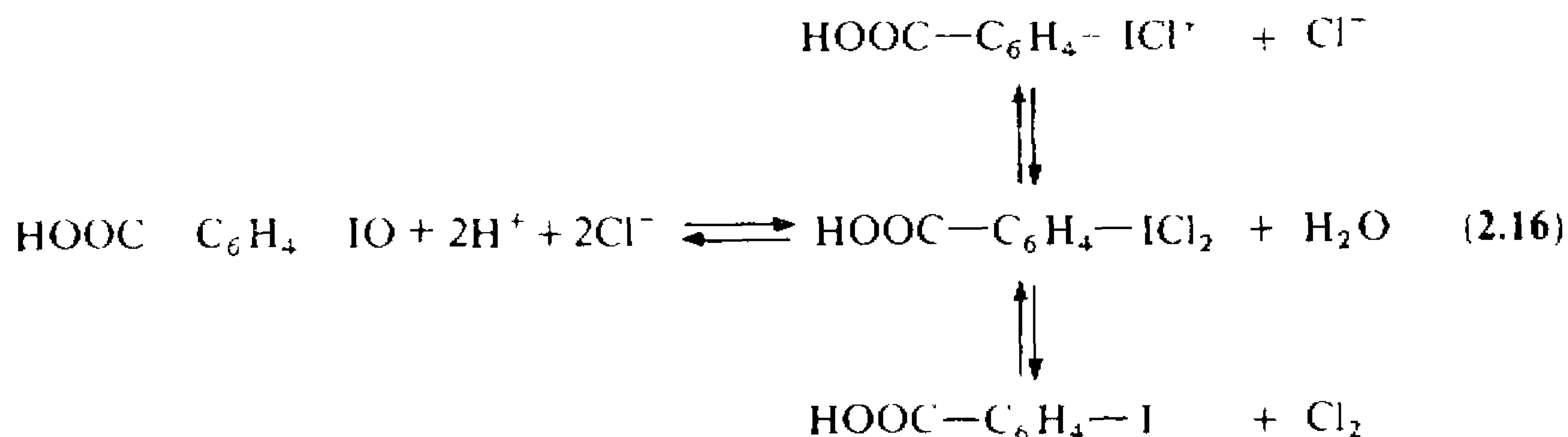
Однако не исключено, что бромирование вызвано примесью брома, присутствующего в бромоциане.

2.5.4.1. Методика [135]. Апоцитохром (0,1—0,5 мкмоль) растворяют в 2 мл смеси (1 : 1) 88%-ной муравьиной и гептафтормасляной кислот, прибавляют 700 мг бромоциана и инкубируют без доступа света в течение 24 ч. Реагент и растворители отгоняют в потоке азота, остаток растворяют в 10 мл воды и высушивают лиофильно. Остаток растворяют в 9 М уксусной кислоте и хроматографируют на колонке с сефадексом G-50.

2.5.5. Расщепление по остатку триптофана *о*-иодозобензойной кислотой

Согласно предложенному методу, белок в 80%-ной уксусной кислоте обрабатывают *о*-иодозобензойной кислотой в присутствии 4 М гуанидин-HCl [120]. Реакция идет избирательно с выходом 70—100%. Однако последующие исследования показали, что метод не столь специфичен, а выход не столь высок, как сообщалось [51—54, 99, 198]. По выходу продуктов реакции предложенная методика сопоставима с другими, где происходит расщепление по триптофану; кроме того, побочно идет расщепление по остатку тирозина. Более детальные исследования показали [52, 53], что в указанных условиях (80%-ная уксусная кислота, 4 М гуанидин-HCl) происходит окислительное галогенирование индольного ядра триптофана и бензольного кольца тирозина с одновременным расщеплением пептидной связи. Если из реакционной смеси исключить галоген, расщепления пептидной связи не происходит. Механизм реакции, вероятно, аналогичен другим реакциям с использованием галогенирующих реагентов (в том числе N-бромосукцинимида). Высказано предположение, что при инкубации 5-иодозобензойной кислоты в кислой среде в присутствии галогенов идет несколько равновесных реакций с образованием ряда промежуточных галогенирующих соединений, включая свободный галоген [уравнение (2.16)]. Следовательно, окислительное галогенирование, приводящее к расщеплению по триптофану и тирозину, обусловлено свойствами системы *о*-иодозобензойная кислота — 4 М гуанидин-HCl, а не присутствием примесей в реагентах, например *о*-иодоксибензойной кислоты [121, 122]. На практике чистоту реагентов проверяют

с помощью различных тестов [52, 53]. С целью свести к минимуму расщепление по тирозину в реакционную смесь предложено добавлять *п*-крезол [52, 122]. С такими изменениями метод вполне может быть использован для расщепления белков по остатку триптофана.



2.5.5.1. *Методика* [122]. *о*-Иодозобензойную кислоту (10 мг) растворяют в 80%-ной уксусной кислоте, содержащей 4 М гуанидин-HCl и 20 мкл *п*-крезола, и инкубируют при 20 °С в течение 2 ч. Затем прибавляют образец белка (5 мг) и инкубируют без доступа света при 20 °С в течение 24 ч. Пептидные фрагменты выделяют с помощью гель-фильтрации на сефадексе.

2.5.6. Другие реагенты

Расщепление по триптофану можно проводить с помощью окислительного галогенирования «активным иодом», который генерируется в системе пероксид водорода — соли иодоводородной кислоты — лактопероксидаза (или пероксидаза хрена). Простые пептиды, содержащие остаток триптофана, расщепляются при pH 5 в течение 10 мин с выходом 30—40%. Для проведения реакции необходимо присутствие всех компонентов указанной системы. С аналогичным выходом идет расщепление по триптофану с помощью других иодирующих агентов, таких, как I_2, I_3^-, ICl и хлороамин T/KI [1]. Вопрос о возможности применения галогенирования в присутствии пероксидазы с целью расщепления белков остается открытым, однако метод заслуживает внимания

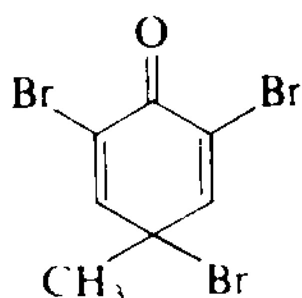
2.5.6.1. Расщепление по триптофану под действием N-хлоросукцинимида. Пептидные связи по карбоксильной группе триптофана избирательно расщепляются в кислой среде под действием N-хлоросукцинимида; остальные пептидные связи при этом не затрагиваются. Опыты на модельных соединениях показали, что как выход, так и скорость реакции здесь несколько меньше, чем в случае N-бромосукцинимида. Однако реакция идет очень избирательно и никаких признаков расщепления по тирозину и гистидину не наблюдается. Пептидные связи триптофана в α-лактальбумине, ингибиторе трипсина (ингиби-

тор Куница), миоглобине и глюкагоне расщепляются под действием N-хлоросукцинимида в водной уксусной кислоте с выходом 19—58% [172]. В некоторых работах [115] рекомендуют вводить в состав реакционной смеси мочевину (далее приводится именно эта методика).

Методика. Концентрация белка в реакционной смеси составляет 0,286 ммоль/л, молярное отношение белок : N-хлоросукцинимид варьирует в зависимости от объекта исследования. Рабочий буфер содержит 27,5%-ную уксусную кислоту и 4,68 *М* мочевину. Реакцию проводят при 20 °С в течение 30 мин и прерывают путем добавления N-ацетил-L-метионина [172]. Согласно типовой методике, образец белка растворяют в дистиллированной воде (1 нмоль/мл) и смешивают (в объемном соотношении 4 : 10) с раствором N-хлоросукцинимида в буфере (1 мл ледяной уксусной кислоты + 1 г мочевины + 1 мл воды).

В образцах цитохрома *с* из различных источников расщепление по триптофану проходит с выходом ~50%.

2.5.6.2. Расщепление с помощью трибромокрезола [137]. Избирательное расщепление белков и пептидов по пептидным связям триптофана проводят с помощью 2,4,6-трибромо-4-метилциклогексадиенона (трибромокрезола) (**59**). Пептидные связи тирозина и гистидина, которые обычно расщепляются под действием бромирующих реагентов, таких, как N-бромосукцинимид, в этих условиях не затрагиваются. Однако тирозин превращается в 3,5-дибромопроизводное, цистеин окисляется в цистеиновую кислоту, метионин — в метионин-S-оксид, идет модификация остатка гистидина. Оптимальными условиями расщепления по триптофану являются следующие: 3 экв. трибромокрезола, pH 3, 20 °С, 5—15 мин. В случае лизоцима селективное расщепление идет с выходом 5—60%. Принято считать, что реакция идет по механизму окислительного галогенирования, как и в случае N-бромосукцинимида.



59

Методика. К раствору глюкагона (0,5 мкмоль) в 2 мл 70%-ной уксусной кислоты прибавляют 25 мкмоль трибромокрезола в 50 мкл диоксана. Инкубируют при перемешивании в течение 15 мин, а затем хроматографируют в 0,1 *М* уксусной кислоте на колонке с сефадексом G-25.

2.5.7. Озонирование

При озонировании пептидов в безводной муравьиной кислоте остаток триптофана превращается в N-формилкинуренин (**60**) [125, 141, 142, 195, 196]. При последующей кислотной обработке в мягких условиях идет отщепление N-формильной группы. При непродолжительном (до 4 ч) нагревании пептидов с модифицированным остатком триптофана (в виде кинуренина

или N-формилкинуренина) в бикарбонатном буфере с выходом 49—59% идет избирательный гидролиз пептидной связи. Принято считать, что активация пептидной связи обусловлена внутримолекулярным каталитическим эффектом γ-кетогруппы N-формилкинуренина [143].

60

При инкубации пептидов, содержащих N-формилкинуренин, в 0,2 М гидразин-ацетатном буфере (pH 3,6) при 100 °С в течение 2 ч образуются гидразоны (**61**), которые затем циклизуются в тетрагидропиридазоны (**62**) с одновременным расщеплением пептидной связи. Выход составляет 35—68%, однако при действии гидразина наблюдается неспецифическое расщепление [125—127]. При восстановлении кинуренинпептидов с помощью $NaBH_4$ [144] или электролитическим способом [63] кинуренин превращается в γ-(*о*-аминофенил)гомосерин (**63**) с последующим расщеплением С- и N-пептидных связей остатков триптофана с выходом 20—40%.

61 **62**

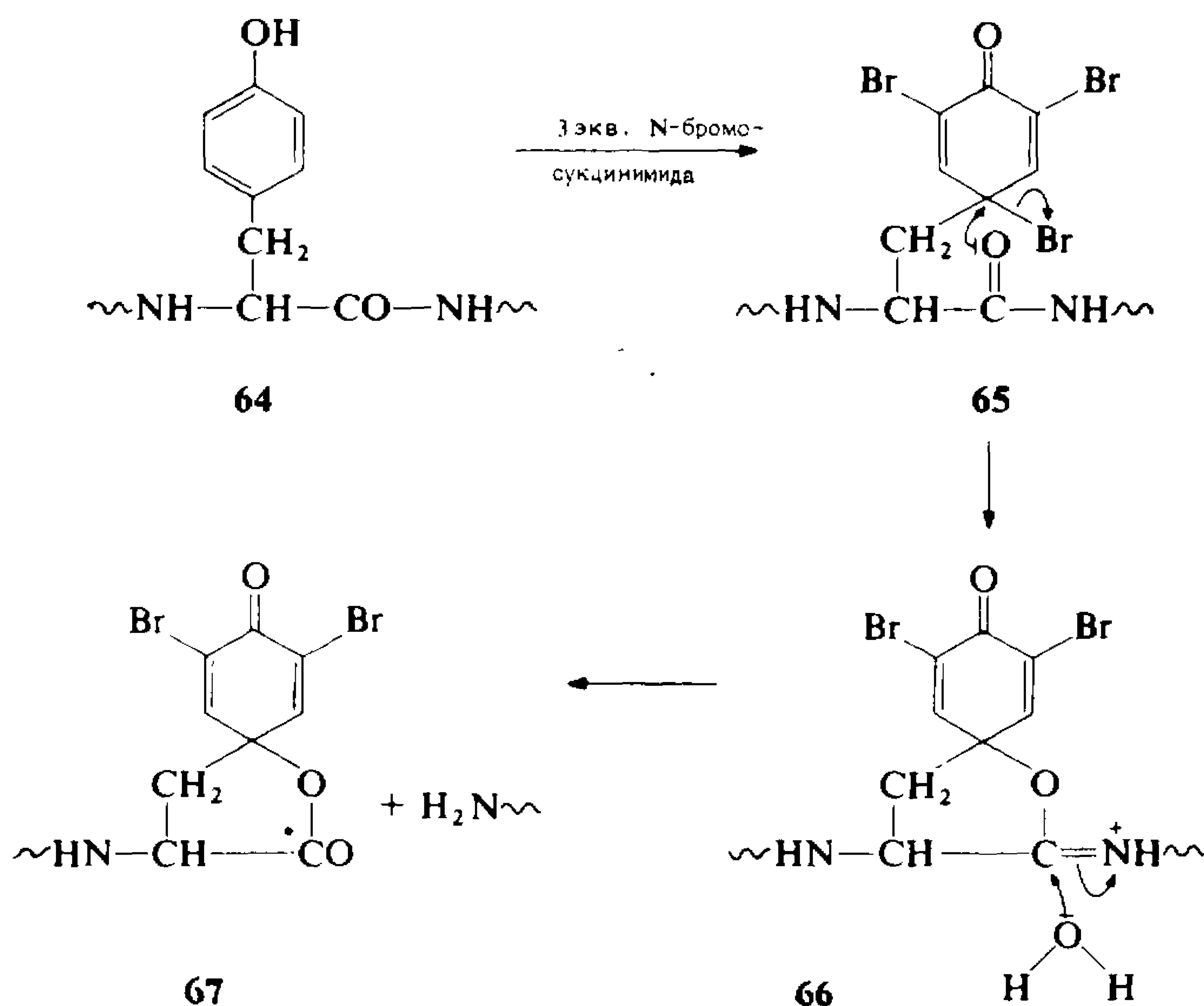
63

Расщепление С-пептидной связи триптофана путем озонолиза не применяется в химии белка из-за низкого выхода, окисления цистеина (в цистеиновую кислоту), метионина (в метионин-S,S-диоксид) и отчасти тирозина.

2.6. Расщепление по остатку тирозина

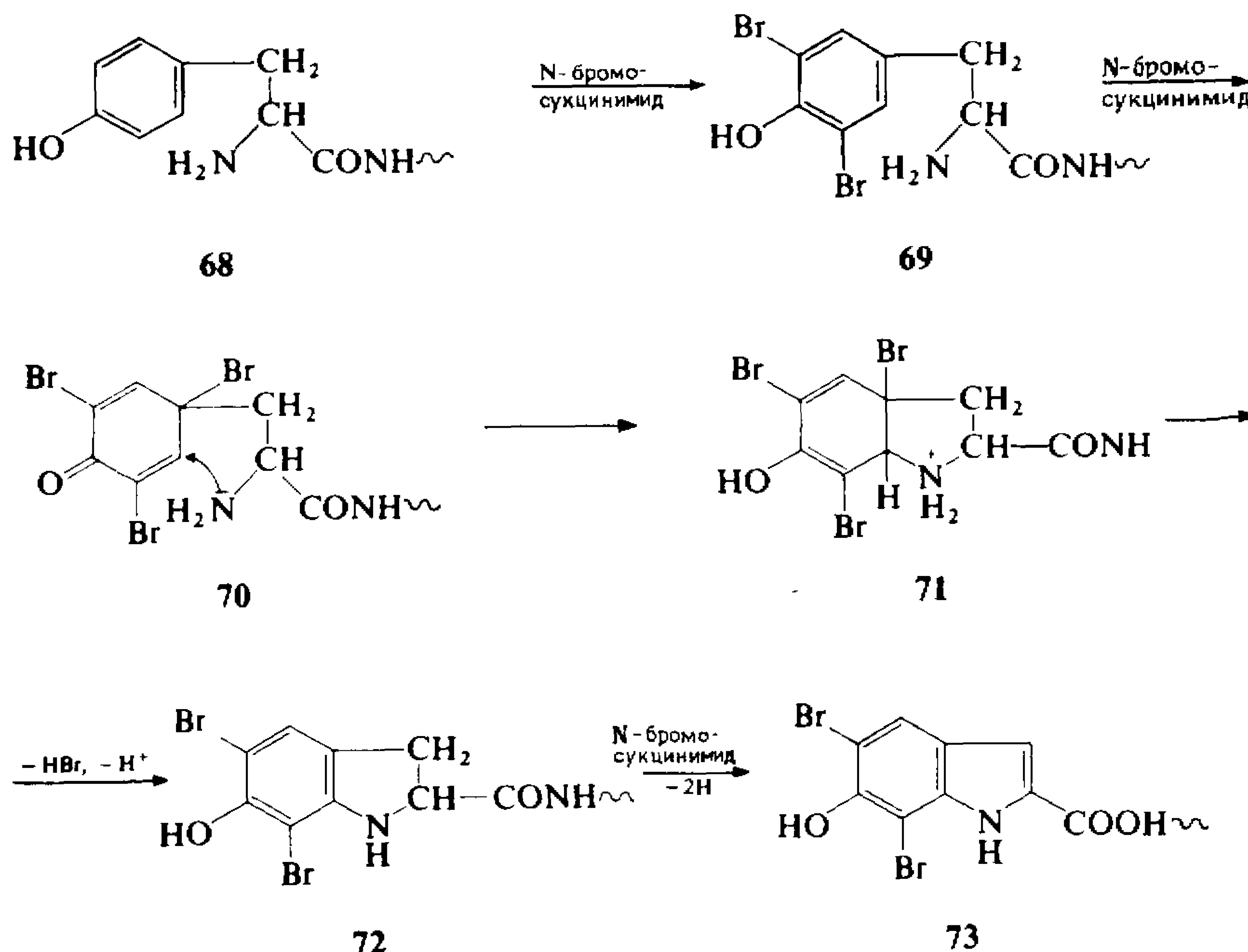
2.6.1. N-Бромосукцинимид

При отсутствии в молекуле белка остатков триптофана избирательное расщепление по тирозину можно проводить с помощью N-бромосукцинимида [33, 148, 165]. При наличии триптофана пептидные связи тирозина будут расщепляться только при большом избытке реагента. По всей вероятности, расщепление по тирозину идет по следующему механизму.



Остаток тирозина при взаимодействии с 2 экв. N-бромосукцинимида бромируется с образованием *о/о'*-дибромотирозина, который при реакции с 1 экв. (третьим) реагента превращается в трибромодиенон (**65**). Последний вступает в 1,5-взаимодействие с карбонильной группой, образуя спиро-γ-иминолактон (**66**), легко гидролизующийся до дибромодиенонспиролактона (**67**) и пептидного фрагмента со свободной аминогруппой. Диенонспиролактон, который был выделен и идентифицирован [33, 165], — сильный хромофор с $\lambda_{max}=260$ нм ($\varepsilon=10\,000 \div 11\,000$). В случае простых пептидов контроль за ходом реакции можно вести по поглощению при 260 нм. N-Пептидная связь остатка тирозина устойчива в кислой среде при избытке N-бромосукцинимида.

На модельных пептидах с N-концевым тирозином показано [208], что свободная α-аминогруппа тирозина принимает участие в альтернативной последовательности реакций, включающей внутреннее присоединение по Михаэлю в промежуточном трибромодиеноне (**70**) с образованием в конечном счете



дибромо-6-гидроксииндолпроизводного (**73**) (последовательность реакций **68→73**).

Расщепление с помощью N-бромосукцинимида пептидной связи тирозина успешно применяется в структурных исследованиях белков и пептидов. В случае S-карбоксиметилрибонуклеазы, не содержащей триптофана, пептидные связи шести остатков тирозина расщеплялись с выходом 30—65% [148, 181]. Поскольку гистоны не имеют триптофана, но содержат тирозин, расщепление N-бромосукцинимидом находит широкое применение при анализе этих белков [19, 147]. Выход обычно неколичественный, но улучшается при избытке реагента (в последнем случае могут идти побочные реакции по остаткам гистидина и серусодержащим аминокислотам).

2.6.1.1. Методика [86]. К раствору гистона H_1 (1 мг/мл) в 50%-ной уксусной кислоте прибавляют N-бромосукцинимид (0,09 мг/мг белка). После инкубации при 20 °C в течение 2 ч к реакционной смеси добавляют вторую порцию N-бромосукцинимида, равную первой, и вновь инкубируют в течение 4 ч.

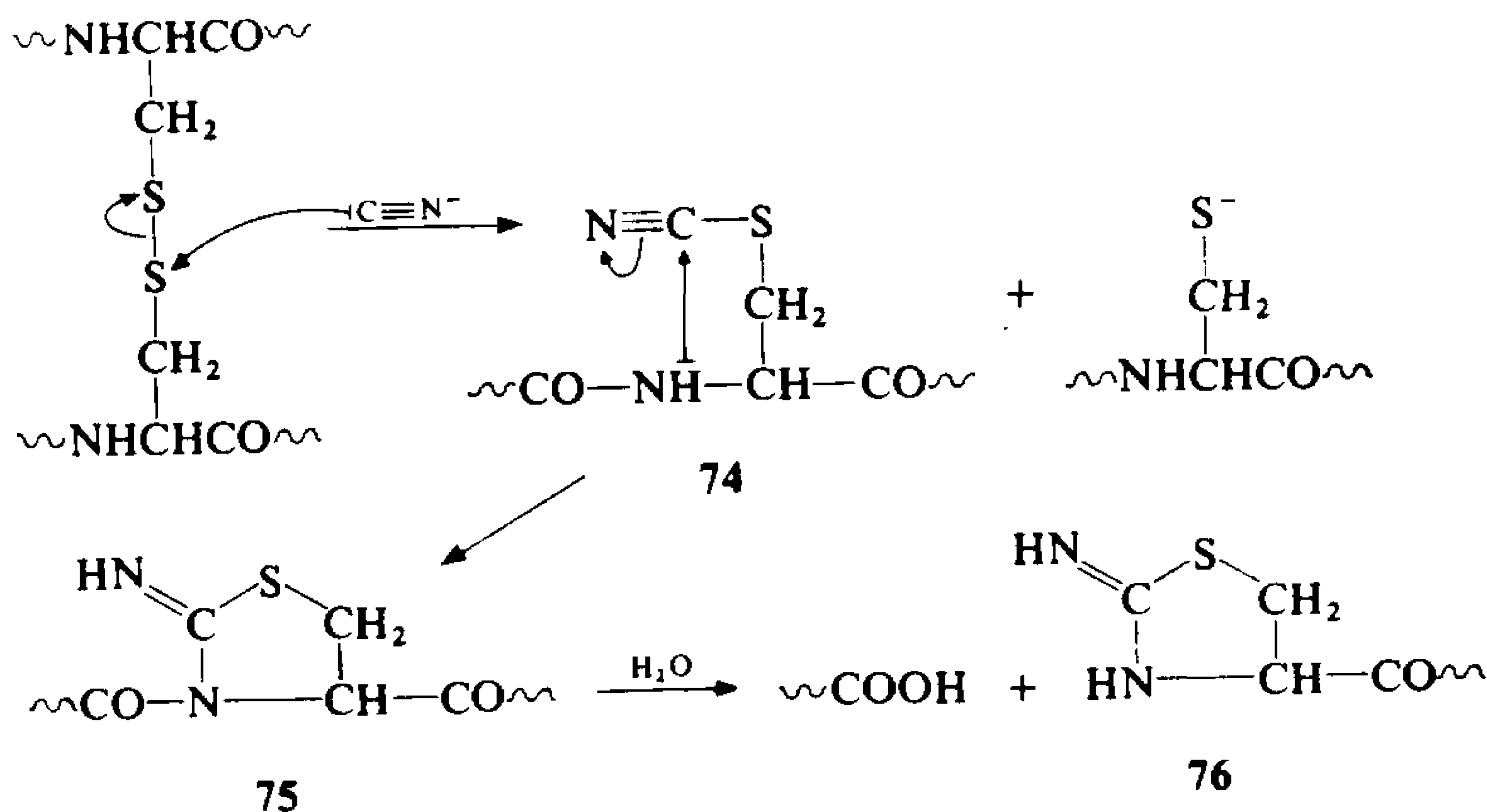
В заключение 10-кратно разбавляют дистиллированной водой и высушивают лиофильно. Пептидные фрагменты фракционируют в 0,01 М HCl на колонке с сефадексом G-100.

2.6.2. Другие реагенты

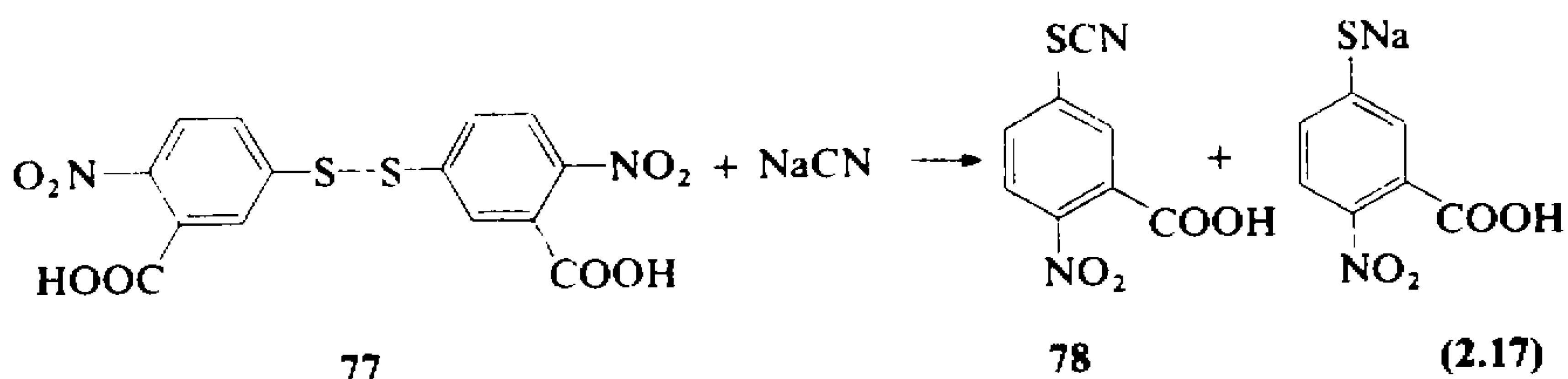
В реакции окислительного расщепления пептидной связи тирозина N-иодосукцинимид столь же эффективен, как и N-бромосукцинимид. Реакцию проводят при pH 4,5, выход на модельных соединениях и простых тирозинсодержащих пептидах составляет 25—95%. Механизм реакции идентичен расщеплению с помощью N-бромосукцинимидом [100]. Показано, что пептидная связь тирозина расщепляется с умеренным выходом при электролитическом окислении на платиновом электроде. При этом в отличие от реакции с N-бромосукцинимидом не наблюдается расщепления по триптофану и гистидину; однако идет окисление других функциональных групп (имидазольных, тиоэфирных, дисульфидных и аминогрупп), правда с меньшей скоростью, чем фенольных групп тирозина. С помощью этого метода были специфически фрагментированы по остатку тирозина ангиотензин, инсулин и рибонуклеаза [30].

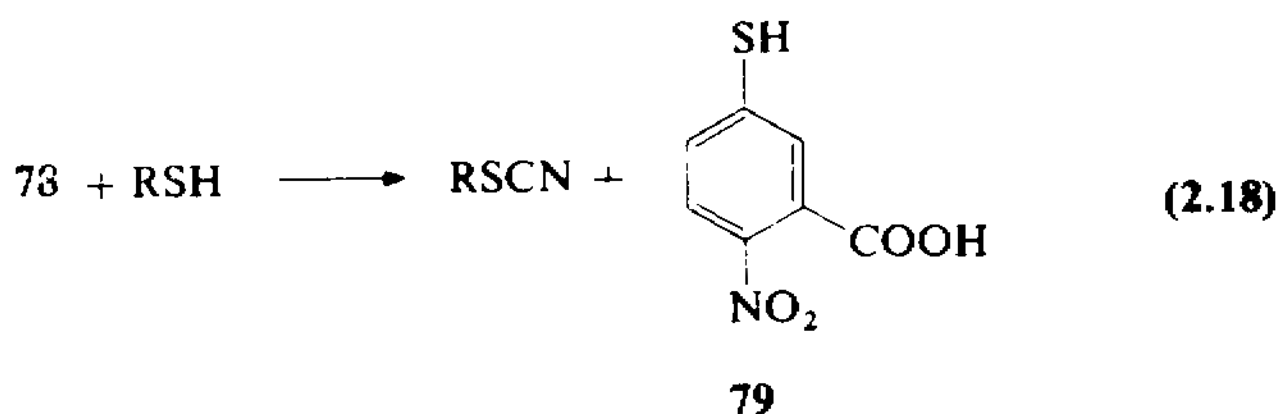
2.7. Расщепление по остатку цистеина

В основе метода избирательного расщепления пептидной связи по аминогруппе остатков цистеина лежит превращение SH-групп в тиоциановые группировки [183]. Впервые о расщеплении пептидной связи цистинсодержащих белков под действием цианидов сообщалось в 1964—66 гг. [23, 24]. Образование остатков тиоцианоаланина (**74**), который циклизуется



в ацилиминотиазолидин (**75**), сопровождается быстрым гидролизом пептидной связи с образованием N-концевого пептида и С-концевого 2-иминотиазолидин-4-карбоксильного фрагмента (**76**) с достаточно высоким выходом. Поскольку расщепление дисульфидных связей цианидами приводит к частичному и случайному образованию тиоцианогрупп, следовало рассчитывать на получение сложной смеси пептидов. Однако на практике при обработке бычьей рибонуклеазы 1000-кратным избытком цианида при pH 8 и 37 °С в течение 48 ч образуется 9 пептидов. По аминокислотному составу полученные фрагменты соответствуют известной структуре рибонуклеазы, а также фрагментам, полученным путем расщепления по N-ацильным связям всех восьми остатков полуцистина [24].

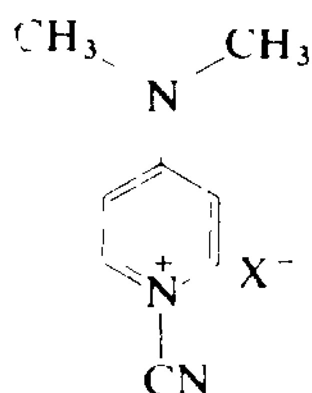


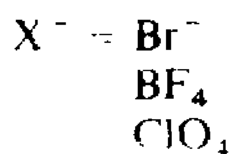


Предложен метод прямого и количественного превращения SH-групп белков в соответствующие тиоцианопроизводные с помощью 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислоты (**78**) [38, 39] [уравнения (2.17) и (2.18)]. Реагент синтезируют по реакции 5,5′-дитиобис-(5-нитробензойной) кислоты с цианидом натрия [уравнение (2.17)]. 2-Нитро-5-тиоцианобензойная кислота довольно мягкий и избирательный цианирующий реагент по SH-группам; его высокая реакционная способность связана с легкостью замещения серусодержащим нуклеофилом легко отщепляющегося *п*-нитротиофенола [уравнение (2.18)]. Меченый реагент получают путем расщепления реактива Эллмана с помощью $Na^{14}CN$. Таким способом можно ввести радиоактивную метку в остаток тиоцианоаланина и следить за скоростью образования меченых 2-иминотиазолидинпептидов.

Показано также, что активным цианирующим агентом SH-групп в белках являются соли 1-циано-4-диметиламинопиридиния (**80**) [199]. Реакцию проводят в нейтральной или кислой

среде, например в 0,1 *М* ацетатном буфере (pH 2—7), содержащем 7 *М* мочевину, при 25 °С в течение 11 мин и при трехкратном молярном избытке реагента.





Двухстадийная методика цианирования включает в качестве первого этапа обработку цистеинсодержащего белка реактивом Эллмана в мягких щелочных условиях (разд. 2.2.2.4). Затем смешанный дисульфид расщепляется под действием цианида в тиоцианоаланинпроизводное белка и анион 2-нитро-5-тиобензоата [194]. Было показано также, что аналогичная двухступенчатая реакция цианирования идет при взаимодействии цианидов со смешанными дисульфидами, образующимися при реакции между цистеинсодержащим белком и 2-нитрофенилсульфенилхлоридом в водной уксусной кислоте [46, 48, 49].

Избирательное расщепление по остаткам тиоцианоаланина проводят в щелочной среде (pH 9) при 37 °С в течение 24 ч. В этих условиях остатки тиоцианоаланина подвергаются β-элиминированию с образованием тиоцианата и дегидроаланина (разд. 2.5.2). Поскольку реакции расщепления и β-элиминирования проходят в слабощелочной среде одновременно, следовало ожидать, что они будут конкурировать и расщепление пептидной связи пройдет с низким выходом. Однако результаты, полученные при анализе ряда белков, свидетельствуют о том, что расщепление идет почти количественно [183]. Низкий выход, вероятно, объясняется неполнотой цианирования. На примере папаина [105], каталитической субъединицы аспартат-транскарбамилазы *E. coli* [194] и изоцитратдегидрогеназы *Azotobacter vinelandii* [28] было установлено, что монотиоцианопроизводные нативного белка не циклизуются, а расщепление пептидных связей происходит только после денатурации [194]. Следовательно, стадию расщепления S-цианированного белка следует проводить в присутствии денатурирующих агентов, например гуанидин-HCl.

2.7.1. Цианирование с помощью 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислоты [96]

Образец белка растворяют в 0,2 *М* трис-ацетатном буфере (pH 8), содержащем 6 *М* гуанидин-HCl. Если белок не содержит S—S-групп, в буфер добавляют небольшой избыток дити-

отреита и инкубируют при 20 °С в течение 30 мин. С целью восстановления S—S-групп создают 10 мМ концентрацию дитиотреита и инкубируют при 37 °С в течение 1—2 ч. Затем прибавляют 2-нитро-5-тиоцианобензойную кислоту (5-кратный молярный избыток в расчете на SH-группу), в случае необходимости pH поддерживают с помощью NaOH и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин. Подкисляют реакционную смесь до pH$\leqslant$4, охлаждают до 4 °С и отделяют низкомолекулярные компоненты диализом или гель-фильтрацией в 50%-ной уксусной кислоте или в другом летучем буфере с низким pH. Образец можно хранить в 50%-ной уксусной кислоте при —20 °С. Для проведения реакции расщепления образец тщательно высушивают, вновь растворяют в 0,1 *М* Na-боратном буфере (pH 9,0), содержащем 6 *М* гуанидин-HCl, и инкубируют при 37 °С в течение 12—16 ч.

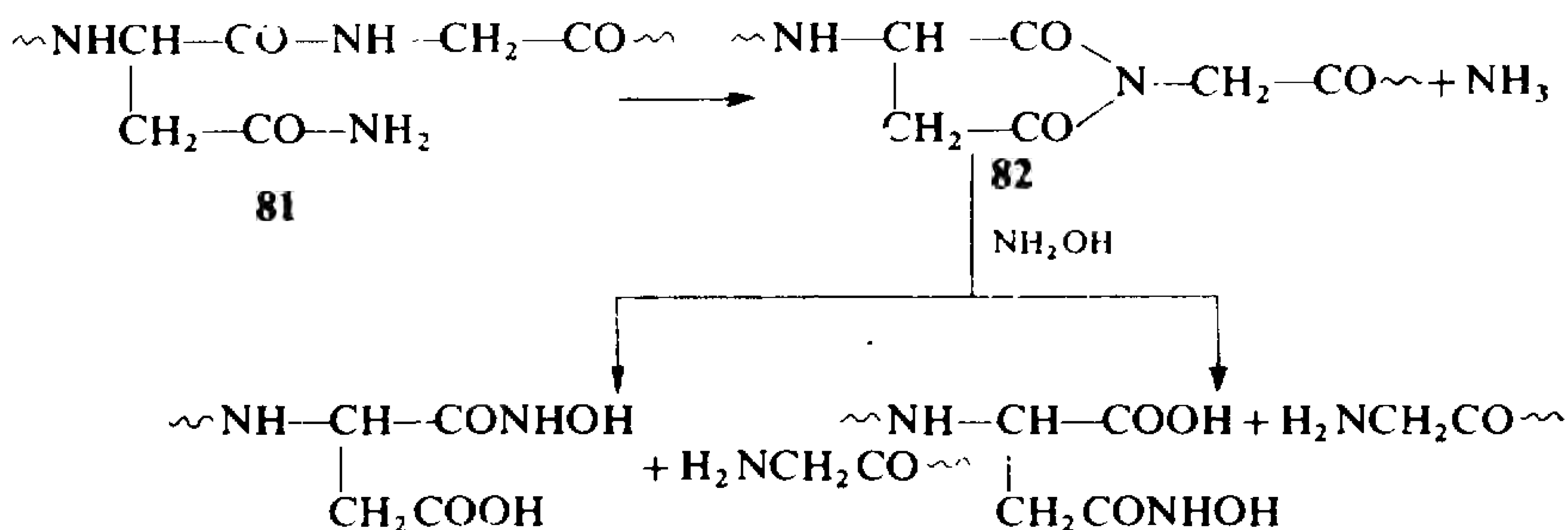
Широкому применению метода расщепления по цистеину с целью получения крупных фрагментов препятствует то обстоятельство, что С-концевой фрагмент блокирован по аминогруппе остатком иминотиазолидина. Попытки деблокирования с помощью классического секвенирования по Эдману дали отрицательный результат [96]. Таким образом, полученные пептиды, за исключением N-концевого, не могут быть использованы для прямого секвенирования. Недавно предложен метод модификации указанных пептидов на никеле Ренея [133]. После обработки защищенных пептидов активным (нейтральным) катализатором W-6 в нейтральной среде при 50 °С в течение 6—10 ч происходит мягкое десульфирование с образованием N-аланилпептидов с выходом 90% [9]. В ходе реакции цистеин и метионин с высокой скоростью превращаются в аланин и α-аминомасляную кислоту соответственно.

2.7.1.1. Методика [133]. Десульфирование проводят в 0,05 *М* трис-HCl-буфере (pH 7) при 50 °С. Готовят никель Ренея W-6 [9]. Смесь 20 мг пептида и 200 мг катализатора в 50 мл буферного раствора нагревают до кипения в течение 7 ч в атмосфере азота. Жидкость над осадком фильтруют через колонку (0,6×5 см) с комплексообразующей смолой Chelex-100. Пептиды элюируют 1 *М* аммиаком, элюат высушивают лиофильно. Благодаря высокому выходу в реакциях расщепления и последующего десульфирования иминотиазолидинпептидов эта методика вполне может использоваться в химии белка с целью получения крупных фрагментов.

2.8. Другие методы химического расщепления пептидных связей

2.8.1. Расщепление связи Asn-Gly

Свойство гидроксиламина специфически расщеплять пептидную связь фрагмента Asn-Gly (81) успешно используется на практике при структурных исследованиях белков и крупных пептидов. Метод основан на способности боковой цепи остатка аспарагина циклизоваться с образованием замещенного сукцинимида (82), который затем подвергается нуклеофильной



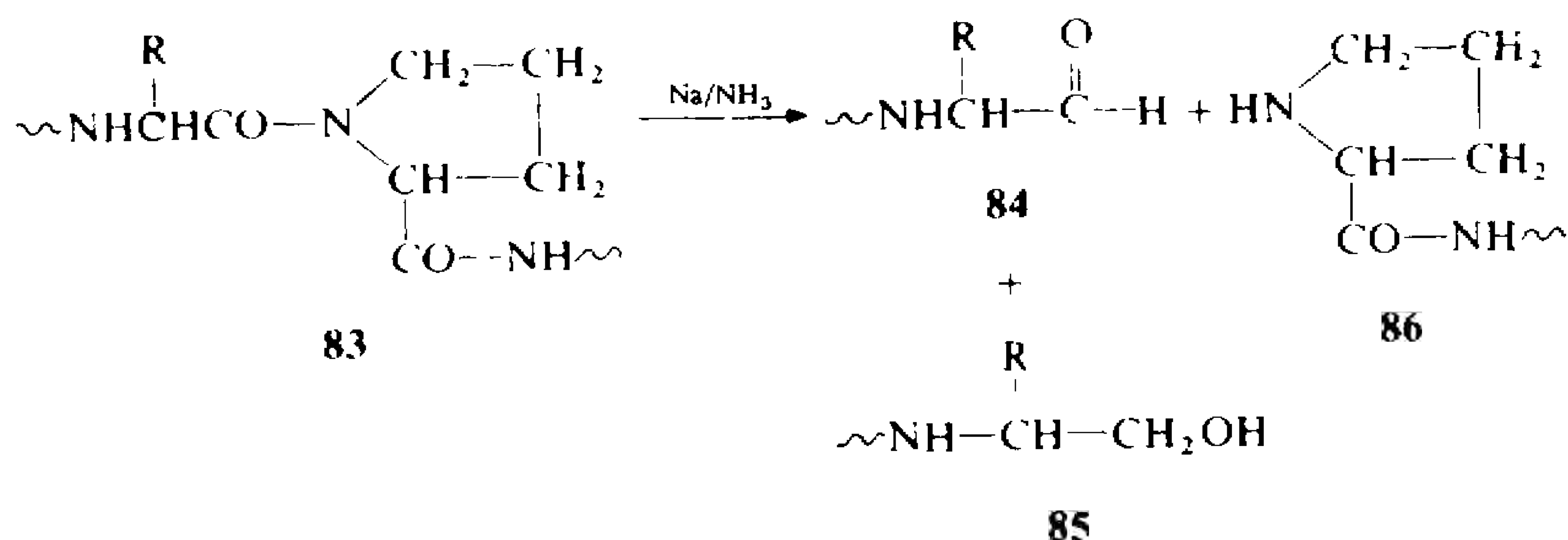
атаке со стороны гидроксиламина [13]. Повышенная лабильность связи Asn-Gly по сравнению с другими связями Asn-X, по-видимому, обусловлена относительной легкостью циклизации при отсутствии пространственных ограничений со стороны боковой группы ближайшего аминокислотного остатка (глицина). Известно, что некоторые эфиры глутаминовой кислоты в пептидах также образуют циклические соединения, однако расщепления связи Gln-Gly под действием гидроксиламина не наблюдается.

Методика расщепления гидроксиламином описана в работе [11]. Более поздние публикации посвящены в основном различным модификациям этой методики, включающей повышение концентрации гидроксиламина, проведение реакции при несколько повышенной температуре, более низком pH, использование в качестве растворителя 6 M гуанидин-HCl и гидроксида лития для установления pH среды.

2.8.1.1. Методика [44]. 102 мг легкой цепи фактора X_1 (в виде S-пиридилэтилпроизводного) растворяют при 20 °C в 25 мл 6 M гуанидин-HCl, содержащего 2% солянокислого гидроксиламина, и подтитровывают 4,5 M LiOH до pH 9,0. В ходе реакции pH поддерживают с помощью 4,5 M LiOH. Оптимальное время проведения реакции составляет 4 ч.

2.8.2. Расщепление по остатку пролина

Третичные амины расщепляются под действием металлического натрия в жидком аммиаке до альдегидов и вторичных аминов [10]. Впервые расщепление в этих условиях N-пептидной связи пролина наблюдали в 1961 г. [85]. В связи с этим были предприняты попытки [8, 207] использовать растворы Na в NH_3



для расщепления связи пролина в белках. В ходе реакции аминокислота, предшествующая остатку пролина, превращается в соответствующий альдегид (**84**) или спирт (**85**) с одновременным отщеплением второго фрагмента с N-концевым пролином (**86**) [181, 207]. Однако метод не свободен от недостатков, главным из которых является неспецифическое расщепление и деградация аминокислот, неустойчивых в щелочной среде. Вследствие этого предприняты попытки несколько модифицировать исходную методику. Гидразид натрия в среде гидразин — эфир при 0 °С в течение 45—60 мин расщепляет модельные пептиды и В-цепь инсулина с выходом 70—100% [103]. Для расщепления модельных пептидов (с остатком пролина), грамицидина и тироцидина С использовали алюмогидрид лития в безводном тетрагидрофуране [154, 155].

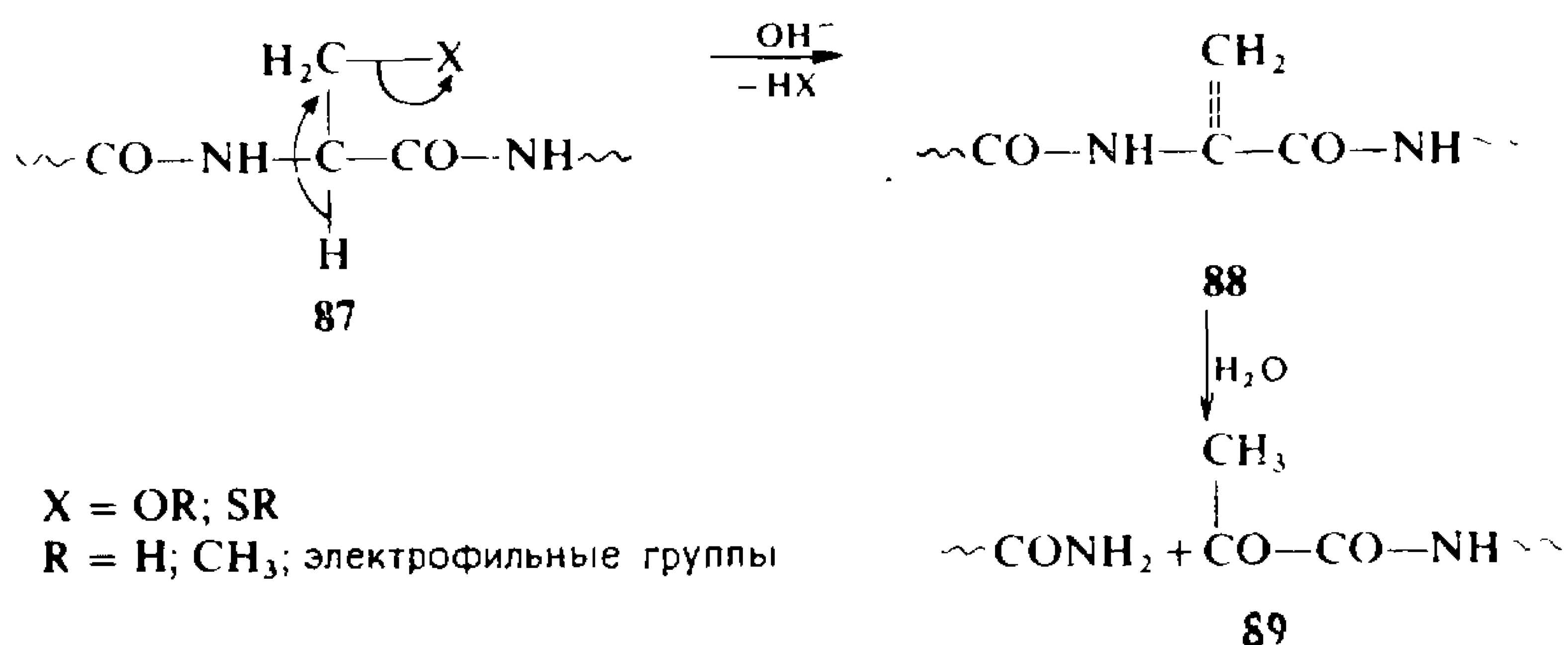
2.8.3. Расщепление по остатку гистидина

Двойная связь в γ—δ-положении имидазольного кольца гистидина в сущности аналогична двойной связи, присутствующей в остатках триптофана и тирозина. На практике пептиды расщепляются по остатку гистидина под действием N-бромосукцинимида, хотя и с меньшим выходом, чем по триптофану [170, 171]. Предположительный механизм реакции, по-видимому, включает образование пятичленного иминолактона, который легко гидролизуется в кислой среде по аналогии с расщеплением пептидов по триптофану и тирозину [181]. Расщепление гистидинсодержащих пептидов N-бромосукцинимидом проводят в пиридин-ацетатном буфере (рН-3) при 100 °С в течение 1 ч.

С целью исключить возможность расщепления по триптофану и тирозину О-ацилируют остатки тирозина [170] и избирательно алкилируют остатки триптофана с помощью 2-гидрокси-5-нитробензилбромида [206]. Из-за низкого выхода и окисления боковых групп некоторых аминокислот, в особенности серусодержащих, эта методика редко применяется для фрагментации белков и пептидов.

2.8.4. Расщепление по остатку дегидроаланина

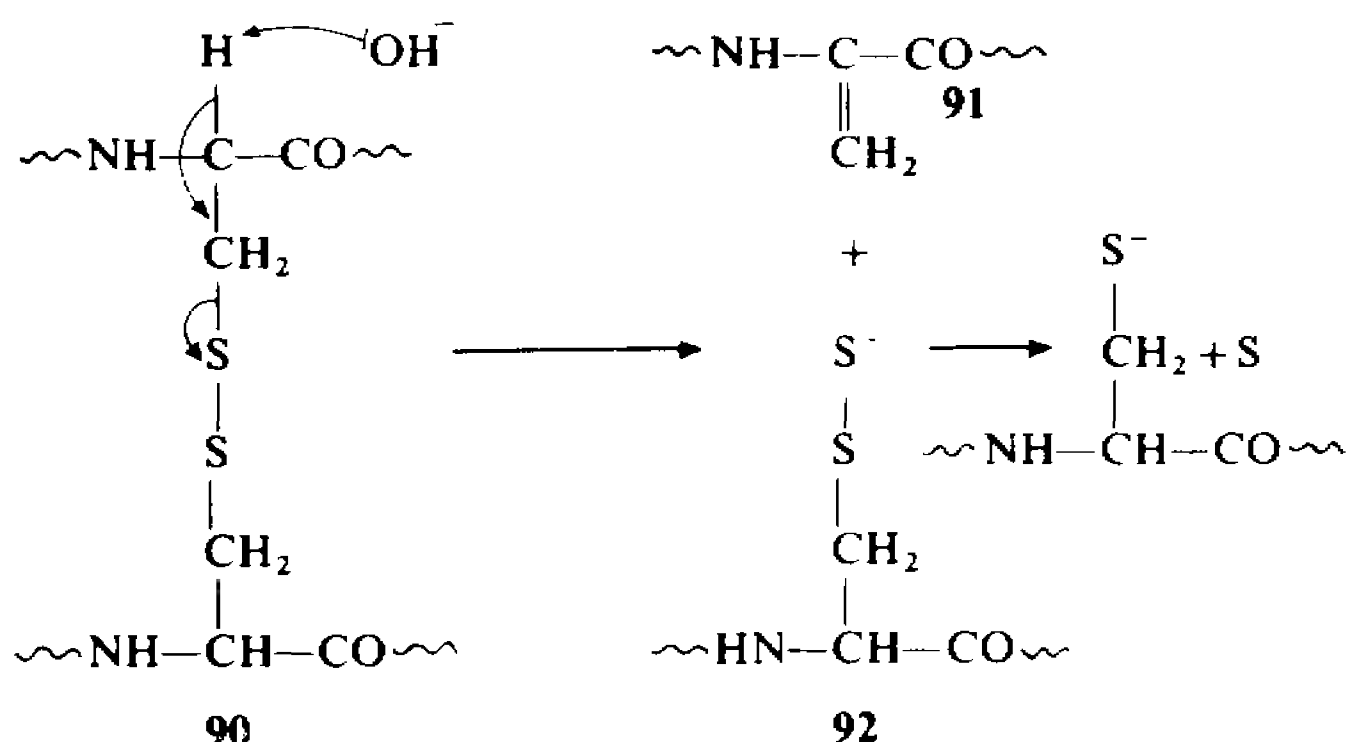
Некоторые производные серина и цистеина (87) в пептидах легко вступают в реакцию β-элиминирования с последующим расщеплением пептидной связи по α-углеродному атому дегидроаланилпептидов (88).



У производных серина, несущих сильные электроноакцепторные группы по гидроксилу, такие, например, как О-тозильная [138] или О-дифенилфосфорная группы [149], процесс β-элиминирования индуцируется в основной среде. Например, химотрипсин путем тозилирования по остатку серина активного центра с помощью тозилфторида и последующей обработки основаниями превращается в дегидрохимотрипсин [184, 201].

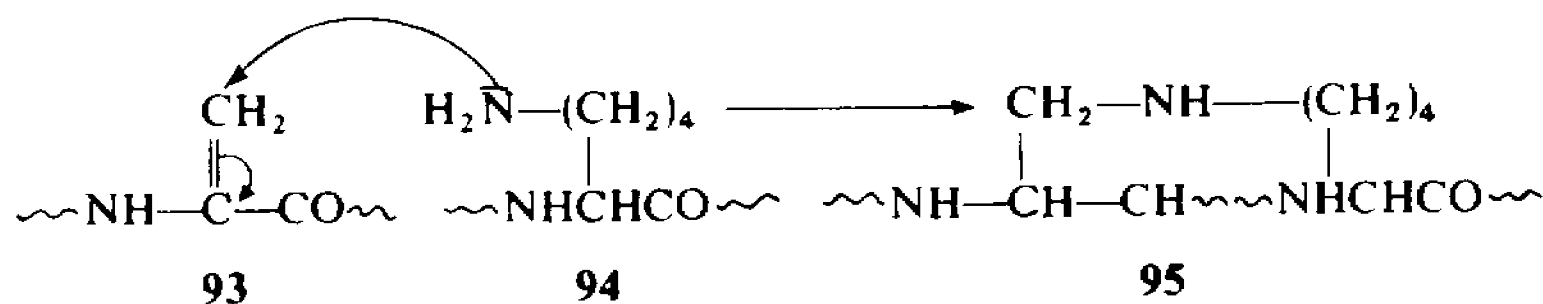
Цистеин превращается в дегидроаланин при S-нитроарилировании остатка цистеина динитрофторобензолом и последующей обработке 0,1 М щелочью [178]. S-Метилсульфоний превращается в дегидроаланин при более низких pH (8,5—9) по сравнению с S-динитрофенилпроизводными [179].

При обработке пептидов щелочью остаток дегидроаланина (**91**) образуется непосредственно из цистина (**90**). Расщепление дисульфидной группы инициируется благодаря атаке гидроксил-ионом протона при α-углеродном атоме с образованием остатка S-тиоцистеина (**92**), который затем превращается в цистеин и свободную серу [189].



Расщепление связи C—S может проходить по обеим сторонам дисульфидного мостика, следовательно, при щелочной обработке цистинсодержащих пептидов образуется сложная смесь дегидроаланинсодержащих производных. Дегидроаланилпептиды расщепляют с помощью гидролиза или окисления [178]. В надмуравьиной кислоте идет окисление дегидроаланина в α,β-дигидроксиаланин, который затем гидролизуется при pH 10 до пептида с амидной группой и фрагмента, несущего на N-конце остаток гидроксипировиноградной кислоты. Расщепление проводят также путем бромирования в водной уксусной кислоте с образованием в качестве промежуточного продукта лабильного α,β-дибромоаланина. В присутствии брома идет расщепление пептидных связей остатков триптофана, тирозина и гистидина [181].

Вместе с тем методу расщепления пептидной связи через промежуточное образование дегидроаланина свойственны существенные недостатки. Остаток дегидроаланина (**93**) может вступать в реакцию с нуклеофилами, например с ε-аминогруппой остатка лизина (**94**) с образованием DL-α-амино-β-



(ε-N-L-лизин)пропионовой кислоты (лизиноаланина) (**95**) [12]. В щелочной среде в присутствии пероксида водорода может идти окисление боковых групп ряда аминокислот, что приводит к глубокой модификации пептидов. Обработка щелочью может сопровождаться побочными реакциями, например транспептидацией, гидролизом амидных групп, а также неспецифическим расщеплением пептидных связей.

2.8.5. Другие методы расщепления пептидных связей

Низший аналог метионина — S-метилцистеин (**96**) — не вступает в реакцию с бромоцианом с последующим расщеплением

~NH—CH—CO—NH~ (CH₂—S(→CN)—CH₃, Br) **96** —(−CH₃SCN, ✕)→ ~NH—CH—CO (CH₂—O) **97**

пептидной связи по карбоксильной группе. В отличие от реакции с метионином в этом случае не образуется соответствующий β-лактон (**97**). В том случае, если аминогруппа S-метилцистеина ацилирована или аминоацилирована (**98**), реакция идет с образованием оксазолиний бромида (**99**) и метилтио-

$CH_3CO—NH—CH(R)—CO—NH—CH(CH_2—S(CH_3)—C≡N\ Br)—CONH$~ **96** → $CH_3CO—NH—CH(R)—CO—NH—CH(CH_2—S^+(CH_3)—CN + Br^-)—CONH$~ **98**

а 0°C, 6 сут

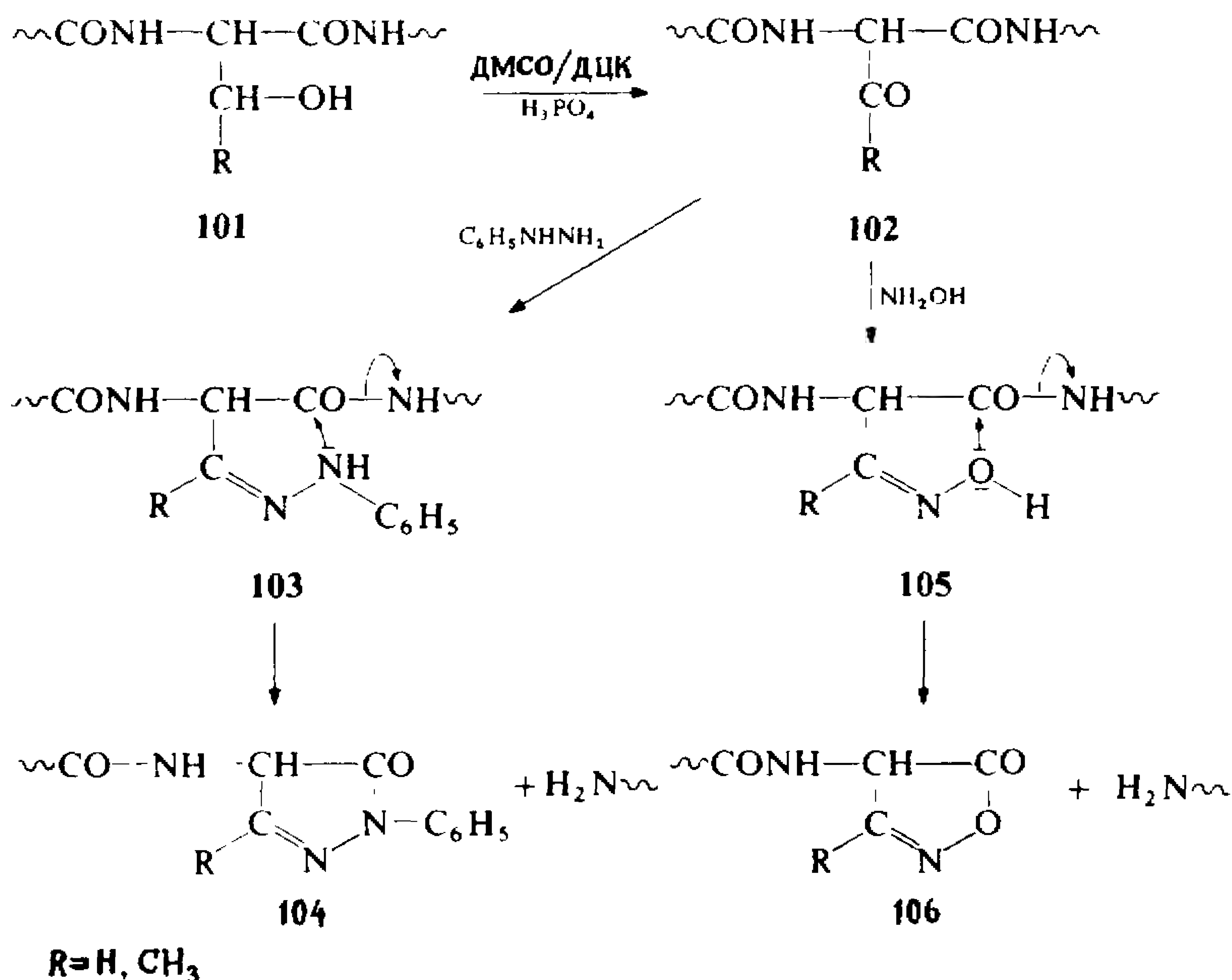
$CH_3CO—NH—CH(R)—C(=\overset{+}{N}H)—O—CH_2—CH—CONH$~ **99** —$H_2O$→ $CH_3CO—NH—CH(R)—CO—O—CH_2—CH(\overset{+}{N}H_3)—CONH$ **100**

б

98 → $CH_3CO—NH—CH(R)—CO—NH—C(=CH_2)—CONH$~ —$H_2O$→ $CH_3CO—NH—CH(R)—CONH_2$ + $CH_3—CO—CONH$~

цианата [70]. При низкой температуре соединение **99** легко гидролизуется в О-ацилпроизводное (О-серилпептид) (**100**) (по механизму *а*). Наконец, указанный эфир гидролизуется далее с образованием ожидаемых фрагментов. При высокой температуре идет реакция β-элиминирования с образованием пептида с дегидроаланином (по механизму *б*). Реакция с успехом применялась в отношении некоторых S-метилцистеинсодержащих пептидов.

Известен метод расщепления пептидных связей серина и треонина (**101**), основанный на предварительном окислении гидроксильной группы дициклогексилкарбодиимидом в присутствии фосфорной кислоты в диметилсульфоксиде (**102**) и



последующей реакции с фенилгидразином при 20 °C в течение нескольких часов или при 40—70 °C в течение 20—40 мин. В ходе реакции промежуточный фенилгидразон (**103**) циклизуется в пиразолон (**104**) с одновременным отщеплением фрагмента со свободной N-концевой аминогруппой. Возможен и другой вариант, когда при действии гидроксиламина образуется промежуточный гидразон (**105**), который затем циклизуется в изооксазолинон (**106**) с образованием фрагмента со свободной аминогруппой [36, 37]. В опытах на модельных пептидах получен достаточно удовлетворительный выход продуктов реакции, однако по всей вероятности метод неприемлем для структурного анализа белков. Недавно опубликованы данные о расщеплении белков по остатку аспарагиновой кислоты под действием разбавленной HCl (pH 2) или разбавленной муравьиной кислоты при 108 °C в течение 2 ч. В этих условиях расщепляются большинство пептидных связей по аспарагиновой кислоте. Одновременно наблюдалось частичное деамидирование аспарагина в инсулине и дезацетилирование N-концевого глицина в цитохроме *c*.

2.9. Заключение

В настоящее время известен ряд химических методов расщепления пептидных связей по остаткам отдельных аминокислот. Возможность практического применения реагента или метода определяется главным образом специфичностью и полнотой реакции. В настоящей главе детально рассмотрены те методы, которые в прошлом и, по-видимому, в будущем нашли и будут находить практическое применение именно потому, что наиболее полно удовлетворяют этим двум требованиям.

Благодаря высокой специфичности и почти количественному выходу продуктов реакции расщепление бромоцианом по остатку метионина находит широкое применение в химии белка. Созданы и проверены на практике удовлетворительные методы расщепления пептидных связей триптофана и цистеина.

Вместе с тем ни один метод не дает возможности получить идеальный набор фрагментов, достаточный для реконструкции полной аминокислотной последовательности. Для достижения этой цели необходимо оптимальное сочетание химических и ферментативных методов. Химические методы расщепления пептидной связи находят применение в области химии пептидов. Методы химической модификации могут применяться при синтезе биологически активных пептидов методом рекомбинантных ДНК.

Вслед за обнаружением влияния соседних групп типа 1,5-взаимодействия в качестве основной причины расщепления пептидной связи γ-замещенных аминокислот, в частности γ,δ-дигидроксилейцина в фаллоидине [204], последовало использование этого принципа при исследовании пептидов, состоящих из других аминокислот. В ходе развития методов структурного анализа белков было изучено множество реагентов, однако еще многие из них ожидают проверки и, возможно, еще пополнят арсенал исследователя.

Литература

1. *Alexander N. M.*, J. Biol. Chem., **249**, 1946—1952 (1974).
2. *Ambler R. P.*, Biochem. J., **96**, 32P (1965).
3. *Anfinsen C. B., Haber E.*, J. Biol. Chem., **236**, 1361—1363 (1961).
4. *Atassi M. Z.*, In: Immunochemistry of Proteins, Atassi M. Z. (Ed), vol. 1, Plenum Press, New York, London, 1977, pp. 114—161.
5. *Atassi M. Z., Rosenthal A. F.*, Biochem. J., **111**, 593—601 (1969).
6. *Atassi M. Z., Suliman A. M., Habeeb A. F. S. A.*, Biochem. Biophys. Acta, **405**, 452—463 (1975).
7. *Benassi C. A., Scoffone E., Veronese F. M.*, Tetrahedron Lett., **49**, 4389—4393 (1965).
8. *Benisek W. F., Raftery M. A., Cole R. D.*, Biochemistry, **6**, 3780—3790 (1967).

9. *Billica R. M., Adkins H.*, Org. Syn. Coll., 3, 176 (1967).
10. *Birch F. J., Cymerman-Craig J., Slaytor M.*, Austr. J. Chem., **8**, 512—518 (1955).
11. *Blumenfeld O. O., Rojkind M., Gallop P. M.*, Biochemistry, **4**, 1780—1788 (1965).
12. *Bohak Z.*, J. Biol. Chem., **239**, 2878—887 (1964).
13. *Bornstein P., Balian G.*, Methods Enzymol., **47**, 132—145 (1977).
14. *Bovio A., Miotti U.*, J. Chem. Soc. Perkin, **11**, 172—177 (1978).
15. *Bradbury A. F., Smyth D. G.*, Biochem. J., **131**, 637—642 (1973).
16. *Brandenburg D.*, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **353**, 263—267 (1972).
17. *Braunitzer G., Aschauer H. J.*, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **356**, 473—474 (1975).
18. *Burstein Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **11**, 4641—4650 (1972).
19. *Bustin M., Cole R. D.*, J. Biol. Chem., **244**, 5291—5294 (1969).
20. *Capon B.*, Quarterly Reviews, **18**, 45—111 (1964).
21. *Capon B., McManus S. P.*, Neighboring Group Participation, Plenum Press, New York, London, 1976.
22. *Carpenter F. H., Shiigi S. M.*, Biochemistry, **13**, 5159—5164 (1974).
23. *Catsimpoolas N., Wood J. L.*, J. Biol. Chem., **239**, 4132—4137 (1964).
24. *Catsimpoolas N., Wood J. L.*, J. Biol. Chem., **241**, 1790—1796 (1966).
25. *Cavins J. F., Friedman M.*, Anal. Biochem., **35**, 489—493 (1970).
26. *Cecil R.*, In: The Proteins, Neurath H. (Ed.), 2nd edn., vol. 1, Academic Press, New York. London, 1963, pp. 379—476.
27 *Cecil R., Weitzman P. D. J.*, Biochem. J., **93**, 1—11 (1964).
28. *Chung F. E., Franzen J. S., Braginski J. E.*, Biochemistry, **10**, 2872—2876 (1971).
29. *Cleland W. W.*, Biochemistry, **3**, 480—482 (1964).
30. *Cohen L. A., Farber L.*, Methods Enzymol., **11**, 299—308 (1967).
31. *Cole R. D.*, Methods Enzymol., **11**, 206—208 (1967).
32. *Cole R. D.*, Methods Enzymol., **11**, 315—317 (1967).
33. *Corey E. J., Haefele L. F.*, J. Am. Chem. Soc., **81**, 2225—2228 (1959).
34. *Corradin G., Harbury H. A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **61**, 1400—1406 (1974).
35. *Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **238**, 2413—2420 (1963).
36. *D'Angeli F., Scoffone E., Filira F., Giormani V.*, Tetrahedron Lett., **24**, 2745—2748 (1966).
37. *D'Angeli F., Giormani V., Filira F., Di Bello C.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **28**, 809—814 (1967).
38. *Degani Y., Patchornik A.*, J. Org. Chem., **36**, 2727—2728 (1971).
39. *Degani Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **13**, 1—11 (1974).
40. *Desnuelle P., Bonjour G.*, Biochim. Biophys. Acta, **7**, 451—459 (1951).
41. *Dyckes D. F., Creighton T. E., Sheppard R. C.*, Nature (Lond.), **247**, 202—204 (1974).
42. *Elliott D. F.*, Biochem. J., **50**, 542—550 (1952).
43. *Ellman G. L.*, Arch. Biochem. Biophys., **82**, 72—77 (1959).
44. *Enfield D. L., Ericsson L. H., Fujikawa K., Walsh K. A., Neurath H., Titani R.*, Biochemistry, **19**, 659—667 (1980).
45. *Fontana A.*, Methods Enzymol., **25**, 419—423 (1972).
46. *Fontana A., Scoffone E.*, Methods Enzymol., **25**, 482—494 (1972).
47. *Fontana A., Toniolo C.*, Progr. Chem. Organic Natl. Compounds, **33**, 309—409 (1976).
48. *Fontana A., Scoffone E., Benassi C. A.*, Biochemistry, **7**, 980—986 (1968).
49. *Fontana A., Veronese F. M., Scoffone E.*, Biochemistry, **7**, 3901—3905 (1968).
50. *Fontana A., Vita C., Toniolo C.*, FEBS Lett., **32**, 139—142 (1973).

51. *Fontana A., Savige W. E., Zambonin M.*, In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, Third Internat. Conf., Birr, C. (Ed.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1980, pp. 309—322.
52. *Fontana A., Dalzoppo D., Grandi C., Zambonin M.*, Biochemistry, **20**, 6997—7004 (1981).
53. *Fontana A., Dalzoppo D., Grandi C., Zambonin M.*, In: Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Fourth Internat. Conf., Elzinga M. (Ed.), Human Press, New Jersey, 1982, pp. 325—334.
54. *Fontana A., Dalzoppo D., Grandi C., Zambonin M.*, Methods Enzymol., **91**, 311—318 (1983).
55. *Fowler A. V., Zabin I.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 1507—1510 (1977).
56. *Foye W. O., Helb A. M., Mickles J.*, J. Pharm. Sci, **56**, 292—293 (1967).
57. *Frank G., Sidler W., Widmer H., Zuber H.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **359**, 1491—1507 (1978).
58. *Fraser J. F., Poulsen K., Haber E.*, Biochemistry, **11**, 4974—4977 (1972).
59. *Friedman M.*, The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides and Proteins, Pergamon Press, New York, 1973.
60. *Friedman M., Krull L. H., Cavins J. F.*, J. Biol. Chem, **245**, 3868—3871 (1970).
61. *Funatsu M., Green N. M., Witkop B.*, J. Am Chem. Soc, **86**, 1846—1848 (1964).
62. *Glendenning M. B., Greenberg D. M., Fraenkel-Conrat H.*, J. Biol. Chem, **167**, 125—128 (1947).
63. *Goethals E., Radzitski P. De*, Bull. Soc. Chim. Belges, **73**, 546—559 (1964)
64. *Goldberger R. F., Anfinsen C. B.*, Biochemistry, **1**, 401—405 (1962).
65. *Grannis G. F.*, Arch. Biochem. Biophys., **91**, 255—265 (1960).
66. *Green N. M., Witkop B.*, Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II, **26**, 659—669 (1964).
67. *Gross E.*, Methods Enzymol., **11**, 238—255 (1967).
68. *Gross E., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1510—1511 (1961).
69. *Gross E., Witkop B.*, J. Biol. Chem., **237**, 1856—1860 (1962).
70. *Gross E., Morell J. L., Lee P. Q.*, Int. Congress of Biochemistry (Tokyo), Abstr., p. IX-535 (1967).
71. *Gurd F. R. N.*, Methods Enzymol., **25**, 424—438 (1972).
72. *Habeeb A. F. S. A.*, Methods Enzymol., **25**, 457—464 (1972).
73. *Hass G. M., Nau H., Biemann K., Grahn D. T., Ericsson L. H., Neurath H.*, Biochemistry, **14**, 1334—1342 (1975).
74. *Heinrikson R. L., Kramer K. J.*, Progress in Bioorganic Chemistry, Kaiser E. T., Kézdy F. J. (Eds.), vol. 3, Wiley, New York, 1974, pp. 141—250.
75. *Hermodson M. A., Ericsson L. H., Neurath H., Walsh K. A.*, Biochemistry, **12**, 3146—3153 (1973).
76. *Hinman R. L., Bauman C. P.*, J. Org. Chem, **29**, 2431—2437 (1964)
77. *Hirs C. H. W.*, J. Biol. Chem., **219**, 611—621 (1956).
78. *Hirs C. H. W.* (Ed.), Methods Enzymol, **11**, 1—988 (1967).
79. *Hirs C. H. W.*, Methods Enzymol., **11**, 197—199 (1967).
80. *Hirs C. H. W.*, Methods Enzymol., **11**, 199—203 (1967).
81. *Hirs C. H. W., Timasheff S. N.* (Eds.), Methods Enzymol., **25**, 1—724 (1972).
82. *Hirs C. H. W., Timasheff S. N.* (Eds.), Methods Enzymol., **47**, 1—668.
83. *Hirs C. H. W., Timasheff S. N.* (Eds.), Methods Enzymol., **91**, 1—693 (1983).
84. *Hirs C. H. W., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **221**, 151—169 (1956).
85. *Hofmann K., Yajima H.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 2289—2293 (1961).
86. *Horn M. J., Laursen R. A.*, FEBS Lett., **36**, 285—288 (1973).

87. *Huang H. V., Bond M. W., Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Methods Enzymol., **91**, 318—324 (1983).
88. *Hurley C. K., Stout J. T.*, Biochemistry, **19**, 410—416 (1980).
89. *Inglis A. S.*, Methods Enzymol., **91**, 324—332 (1983).
90. *Inglis A. S., Edman P.*, Anal. Biochem., **37**, 73—80 (1970).
91. *Inglis A. S., Liu T.-Y.*, J. Biol. Chem., **245**, 112—116 (1970).
92. *Inglis A. S., McMahon D. T. W., Roxburgh C. M., Takayanagi H.*, Anal. Biochem., **72**, 86—94 (1976).
93. *Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W.*, Science, **198**, 1056—1063 (1977).
94. *Itano H. A., Robinson E. A.*, J. Biol. Chem., **247**, 4819—4824 (1972).
95. *Iwai K., Ando T.*, Methods Enzymol., **11**, 263—282 (1967).
96. *Jacobson G. R., Schaffer M. H., Stark G. R., Vanaman T. C.*, J. Biol. Chem., **248**, 6583—6591 (1973).
97. *Jauregui-Adell J., Marti J.*, Anal. Biochem., **69**, 468—473 (1975).
98. *Jocelyn P. C.*, Biochemistry of the SH-Group, Academic Press, New York, 1972.
99. *Johnson P., Stockmal V. B.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **94**, 697—703 (1980).
100. *Junek H., Kirk K. L., Cohen L. A.*, Biochemistry, **8**, 1844—1848 (1969).
101. *Kasper C. B.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), 2nd edn., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975, pp. 114—161.
102. *Katsoyannis P. G.*, In: Diabetes, Proc. Congr. Internat. Diabetes Fed., 6th 1967, Ostman J. (Ed.), Exerpta Medica, Amsterdam, 1969, pp. 379—394.
103. *Kauffmann T., Sobel J.*, Liebig's Ann. Chem., **698**, 235—241 (1966).
104. *Kenyon G. L., Bruice T. W.*, Methods Enzymol., **47**, 407—430 (1977).
105. *Klein I. B., Kirsch J. F.*, J. Biol. Chem., **244**, 5928—5935 (1969).
106. *Konigsberg W.*, Methods Enzymol., **25**, 185—188 (1972).
107. *Konigsberg W., Steinman H. M.*, In: The Proteins, Neurath H., Hill R. L. (Ed.), 3rd edn., vol. 3, Academic Press, New York, 1977, pp. 1—178.
108. *Landon M.*, Methods Enzymol., **47**, 145—149 (1977).
109. *Lawson W. B., Schramm H. J.*, J. Am. Chem. Soc., **84**, 2017—2018 (1962).
110. *Lawson W. B., Gross E., Foltz C. M., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1509—1510 (1961).
111. *Leach S. J., Meschers F., Swanepoel O. A.*, Biochemistry, **4**, 23—27 (1965).
112. *Lenard J., Hess G. P.*, J. Biol. Chem., **239**, 3275—3281 (1964).
113. *Lenard J., Schally A. V., Hess G. P.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **14**, 498—502 (1964).
114. *Lindley H.*, Nature (Lond.), **178**, 647—648 (1956).
115. *Lischwe M. A., Sung M. T.*, J. Biol. Chem., **252**, 4976—4980 (1977).
116. *Liu T.-L.*, In: The Proteins, Neurath H., Hill R. L. (Ed.), 3rd edn., vol. 3, Academic Press, New York, 1977, pp. 239—402
117. *Liu T.-Y., Chang Y. H.*, J. Biol. Chem., **246**, 2842—2848 (1971).
118. *Liu T.-Y., Inglis A. S.*, Methods Enzymol., **25**, 55—60 (1972).
119. *MacLaren J. A., Sweetman B. J.*, Austr. J. Chem., **19**, 2355—2360 (1966).
120. *Mahoney W. C., Hermodson M. A.*, Biochemistry, **18**, 3810—3814 (1979).
121. *Mahoney W. C., Hermodson M. A.*, In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, Proc. Third Internat. Conf., Birr C. (Ed.), Elsevier/North Holland, Heidelberg, Amsterdam, New York, Oxford, 1980, pp. 323—328.
122. *Mahoney W. C., Smith P. K., Hermodson M. A.*, Biochemistry, **20**, 443—448 (1981).
123. *Martenson R. E., Deibler G. E., Kramer A. J.*, Biochemistry, **16**, 216—221 (1977).
124. *Milstein C., Sanger F.*, Biochem. J., **79**, 456—469 (1961).
125. *Morishita M., Sakiyama F.*, Bull Chem. Soc. Japan, **43**, 524—530 (1970).

126. *Morishita M., Sakiyama F., Narita K.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **40**, 433 (1967).
127. *Morishita M., Sowa T., Sakiyama F., Narita K.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **40**, 632—639 (1967).
128. *Naughton M. A., Sanger F., Hartley B. S., Shaw D. C.*, Biochem. J., **77**, 149—163 (1960).
129. *Niketic B., Thomsen J., Kristiansen K.*, Eur. J. Biochem., **46**, 547—551 (1974).
130. *Nute P. E., Mahoney W. C.*, Biochemistry, **18**, 467—472 (1979).
131. *Ohno M., Spande T. F., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 343—348 (1970).
132. *Omenn G. S., Fontana A., Anfinsen C. B.*, J. Biol. Chem., **245**, 1895—1902 (1970).
133. *Otieno S.*, Biochemistry, **17**, 5468—5474 (1978).
134. *Ozols J., Gerard C.*, J. Biol. Chem., **252**, 5986—5989 (1977).
135. *Ozols J., Gerard G.*, J. Biol. Chem., **252**, 8549—8553 (1977).
136. *Ozols J., Gerard C.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 3725—3729 (1977).
137. *Patchornik A., Lawson W. B., Gross E., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **82**, 5923—5927 (1960).
138. *Photaki I.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 1123—1126 (1963).
139. *Pihl A., Lange R.*, J. Biol. Chem., **237**, 1356—1362 (1962).
140. *Piszkiewicz D., Landon M., Smith E. L.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **40**, 1173—1178 (1970).
141. *Previero A., Scoffone E., Benassi C. A., Pajetta P.*, Gazz. Chim. Ital, **93**, 849—858 (1963).
142. *Previero A., Coletti M.-A., Galzigna L.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **16**, 195—198 (1964).
143. *Previero A., Coletti-Previero M.-A., Jollès P.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **22**, 17—21 (1966).
144. *Previero A., Coletti-Previero M.-A., Jollés P.*, Biochem. Biophys. Acta., **124**, 400—402 (1966).
145. *Raftery M. A., Cole R. D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **10**, 467—472 (1963).
146. *Raftery M. A., Cole R. D.*, J. Biol. Chem., **241**, 3457—3461 (1966).
147. *Rall S. C., Cole R. D.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 1800—1801 (1970).
148. *Ramachandran L. K., Witkop B.*, Methods Enzymol., **11**, 283—299 (1967).
149. *Riley G., Turnbull J., Wilson W.*, J. Chem. Soc., 1373—1379 (1957).
150. *Rüegg U. T.*, Methods Enzymol., **47**, 123—126 (1977).
151. *Rüegg U. T., Rudinger J.*, Int. J. Peptide Protein Res., **6**, 447—456 (1974).
152. *Rüegg U. T., Rudinger J.*, Methods Enzymol., **47**, 111—116 (1977).
153. *Rüegg U. T., Rudinger J.*, Methods Enzymol., **47**, 116—122 (1977).
154. *Ruttenberg M. A., King T. P., Craig L. C.*, Biochemistry, **3**, 758—764 (1964).
155. *Ruttenberg M. A., King T. P., Craig L. C.*, Biochemistry, **4**, 11—18 (1965).
156. *Ryle A. P., Sanger F.*, Biochem. J., **60**, 535—540 (1955).
157. *Sanger F.*, Biochem. J., **44**, 126—128 (1949).
158. *Sanger F., Thonpson E. O. P.*, Biochim. Biophys. Acta, **9**, 225—226 (1952).
159. *Sanger F., Thompson E. O. P.*, Biochem. J., **53**, 353—366 (1953).
160. *Sanger F., Thompson E. O. P.*, Biochim. Biophys. Acta, **71**, 468—471 (1963).
161. *Savige W. E.*, Austr. J. Chem., **28**, 2275—2287 (1975).
162. *Savige W. E., Fontana A.*, Methods Enzymol., **47**, 442—453 (1977).
163. *Savige W. E., Fontana A.*, Methods Enzymol., **47**, 459—469 (1977).
164. *Savige W. E., Fontana A.*, Int. J. Peptide Protein Res., **15**, 285—297 (1980).
165. *Schmir G. L., Cohen L. R., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **81**, 2228—2233 (1959).

166. *Schroeder W. A., Shelton J. R., Robberson B.*, Biochim. Biophys. Acta, **147**, 590—592 (1967).
167. *Schroeder W. A., Shelton J. B., Shelton J. R.*, Arch. Biochem. Biophys., **130**, 551—556 (1969).
168. *Schultz J., Allison H., Grice M.*, Biochemistry, **1**, 694—698 (1962).
169. *Shaltiel S., Patchornik A.*, Bull. Res. Council Israel, **10A**, 48 (1961).
170. *Shaltiel S., Patchornik A.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 2799—2806 (1963).
171. *Shaltiel S., Patchornik A.*, Israel J. Chem., **1**, 187—190 (1963).
172. *Shechter Y., Patchornik A., Burstein Y.*, Biochemistry, **15**, 5071—5075 (1976).
173. *Sheppard R. C.*, In: Peptides: Structure and Biological Function, Gross E., Meienhofer J. (Eds.), Pierce, Rockford, Illinois, 1979, pp. 577—585.
174. *Shotton D., Hartley B. S.*, Biochem. J., **131**, 643—675 (1973).
175. *Slobin L. I., Singer S. J.*, J. Biol. Chem., **243**, 1777—1786 (1968).
176. *Smith D. J., Maggio E. T., Kenyon G. L.*, Biochemistry, **4**, 766—771.
177. *Smyth D. G., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **237**, 1845—1850 (1962).
178. *Sokolovsky M., Patchornik A.*, J. Am. Chem. Soc., **86**, 1859—1860 (1964).
179. *Sokolovsky M., Sadeh T., Patchornik A.*, J. Am. Chem. Soc., **86**, 1212—1217 (1964).
180. *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, Anal. Chem., **30**, 1190—1206 (1958).
181. *Spande T. F., Witkop B., Degani Y., Patchornik A.*, Adv. Protein Chem., **24**, 97—260 (1970).
182. *Stark G. R.*, Methods Enzymol., **11**, 125—138 (1967).
183. *Stark G. R.*, Methods Enzymol., **47**, 129—132 (1977).
184. *Strumeyer D. H., White W. N., Koshland D. E.*, Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **50**, 931—935 (1963).
185. *Swallow D. L., Abraham E. P.*, Biochem. J., **70**, 364—373 (1958).
186. *Synge R. L.*, Biochem. J., **39**, 351—353 (1945).
187. *Tang J. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **102**, 593—599 (1967).
188. *Tang J. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **118**, 611—623 (1970).
189. *Tarbell D. S., Harnisch D. P.*, Chem. Rev., **49**, 1—90 (1951).
190. *Thompson A. R.*, Biochem. J., **60**, 507—515 (1955).
191. *Titani K., Hermodson M. A., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H.*, Biochemistry, **11**, 2427—2435 (1972).
192. *Toennies G., Homiller R. P.*, J. Am. Chem. Soc., **64**, 3054—3056 (1942).
193. *Torchinskii Y. M.*, Sulfhydryl and Disulfide Groups of Proteins, Plenum Press, New York, 1974.
194. *Vanaman T. C., Stark G. R.*, J. Biol. Chem., **245**, 3565—3573 (1970).
195. *Veronese F., Fontana A., Boccû E., Benassi C. A.*, Gazz. Chim. Ital., **97**, 321—331 (1967).
196. *Veronese F. M., Boccû E., Benassi C. A., Scoffone E.*, Z. Naturforsch., **24**, 294—300 (1969).
197. *Wachter E., Werhahn R.*, Anal. Biochem., **97**, 56—64 (1979).
198. *Wachter E., Werhahn R.*, In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, Proc. Third Internat. Conf., Birr C. (Ed.), Elsevier/North Holland, Heidelberg, Amsterdam, New York, Oxford, 1980, pp. 21—33.
199. *Wakselman M., Guibejampel E., Raoult A., Busse W. D.*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 21—22 (1976).
200. *Waxdal M. J., Konigsberg W. H., Henley W. L., Edelman G. M.*, Biochemistry, 7, 1959—1966 (1968).
201. *Weiner H., White W. N., Hoare D. G., Koshland D. E.*, J. Am. Chem. Soc., **8**, 3851—3859 (1966).
202. *White F. H., Jr.*, J. Biol. Chem., **235**, 383—389 (1960).
203. *White F. H., Jr.*, Methods Enzymol., **25**, 387—392 (1972).
204. *Wieland T., Schön W.*, Liebig's Ann. Chem., **593**, 157—178 (1955).

205. *Wieland T., Lamperstorfer C., Birr C.*, Makromol. Chem., **92**, 277—286 (1966).
206. *Wilchek M., Witkop B.*, Biochem. Biophys, Res. Commun., **26**, 296—300 (1967).
207. *Wilchek M., Sarid S., Patchornik A.*, Biochim. Biophys Acta, **104**, 616—618 (1965).
208. *Wilchek M., Spande T., Milne G., Witkop B.*, Biochemistry, **7**, 1777—1786 (1968).
209. *Witkop B.*, Adv. Protein Chem., **16**, 221—321 (1961).
210. *Wootton J. C., Chambers G. K., Holder A. A., Baron A. J., Taylor J. G., Fincham J. R. S., Blumenthal K. M., Moon K., Smith E. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **71**, 4361—4365 (1974).
211. *Zeitler H.-J., Eulitz M.*, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **16**, 669—674 (1978).
212. *Benesch R. E., Benesch R.*, J. Am. Chem. Soc., **80**, 1666 (1958).

Глава 3

ФРАГМЕНТАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ФЕРМЕНТАТИВНЫМИ МЕТОДАМИ

Дж. М. УИЛКИНСОН (J. M. WILKINSON, *Department of Biochemistry, Royal College of Surgeons of England, 35/43, Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PN, U.K.*)

3.1. Введение

Наличие протеолитических ферментов с разнообразной специфичностью позволяет использовать различные подходы к расщеплению полипептидных цепей с целью получения определенных наборов пептидов. Этой проблеме посвящено много обзоров; в одних рассматриваются общие свойства ферментов [7, 62, 76], в других основное внимание уделяется технике ферментативного расщепления полипептидной цепи [42, 50, 56, 99]. Сведения относительно недавно открытых ферментов можно найти в работе [51].

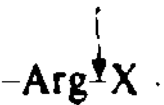
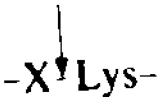
С появлением автоматических методов секвенирования первоочередной задачей исследователя стало получение нескольких крупных и легко доступных фрагментов исследуемого белка. В связи с этим в последнее время возрос интерес к использованию ферментов с высокой специфичностью. Ряд таких ферментов нашел широкое применение, другие, возможно, будут использоваться в ближайшем будущем. Однако известных в настоящее время ферментов бывает недостаточно для получения наборов пептидов с перекрывающейся последовательностью и вопрос поиска новых высокоспецифичных ферментов остается открытым.

В этой главе приведена информация о большинстве ферментов, получивших широкое практическое применение, включая возможные источники получения коммерческих препаратов. Сведения о специфичности ферментов приведены в табл. 3.1 и 3.2. Рассматриваются также вопросы практического применения ферментативных методов гидролиза с учетом последних публикаций; приводятся методы предварительной обработки белков и методы химической модификации с целью ограничения или расширения специфичности фермента.

Обычно в химии белка используют протеолитические ферменты, доступные в виде высокоочищенных коммерческих препаратов. Приготовление препаратов ферментов собственными силами не оправдывает себя. К сожалению, многих ферментов, представляющих несомненный интерес, все еще нет в продаже.

Таблица 3.1. Протеазы с высокой специфичностью

Фермент	Оптимум pH	Основной тип гидролиза[a]	Дополнительный тип гидролиза	Гидролиз не идет
Трипсин	7—9	-Lys↓X- ; -Arg↓X; -Aec↓X-		-Lys↕Pro-
Тромбин	8	-Arg↓X- (X = Gly, Ala, Val, Asp, Cys, Arg)		
Протеаза V8 из *S. aureus*	4 и 7,8	-Glu↓X-	-Asp↓X-	-Glu↕Pro-; -Glu↕Glu-
Клострипаин	7,7	-Arg↓X-	-Lys↓X-	

Протеаза подчелюстной железы мыши	7,5—8	 –Arg–X		
Протеаза *A. mellea*	8,0	 –X–Lys–; –X–Aec	–Arg–X	–X–Lys–Pro–
Протеаза *Myxobacter AL1*	9,0	 –X–Lys–		
Постпролинспецифичная протеаза	7,5—8	 –Pro–X–		–Pro–Pro–

[a] Aec — аминоэтилцистеин.

Таблица 3.2. Протеазы с более широкой специфичностью

Фермент	Оптимум pH	Пептидные связи, чувствительные к действию фермента	Гидролиз не идет
Химотрипсин	7—9	-H↓X- H = Tyr, Phe, Trp, Leu	-H↓Pro
Термолизин	7—8	X↓H- H = Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp	-X↓H-Pro
α-Протеаза *Crotalus atrox*	7,5—8	-X↓H- (аналогично термолизину)	
Пепсин	2	-X↓H↓Y-, -X↓Glu↓Y- H — ароматический или объемный алифатический аминокислотный остаток	
Папаин	5—7,5	-Phe-X↓Y- идет гидролиз ряда других пептидных связей	
Эластаза	7—9	-N↓Y- *N* — небольшой нейтральный или гидрофобный аминокислотный остаток (Ser, Ala, Gly, Val, Leu)	
α-Литическая протеаза	7—8	-N↓Y- (аналогично эластазе)	

Тем не менее ниже приводятся методики применения некоторых из них в расчете на то, что соответствующие препараты появятся в ближайшем будущем.

3.2. Приготовление субстрата

Полнота ферментативного гидролиза определяется физическим состоянием субстрата. Так, например, если нативный белок и подвергается протеолизу, то весьма вероятно, что такой гидролиз будет ограниченным. Однако в случае необходимости получения фрагментов белка, обладающих частичной биологической

активностью, этот метод вполне применим. Такой подход подробно обсуждается в разделе, посвященном использованию трипсина, пепсина и папаина. В общем случае для обеспечения полноты гидролиза белок денатурируют с обязательным восстановлением дисульфидных связей.

В большинстве случаев достаточно кипячения в течение 5—10 мин при нейтральном pH или осаждения 5%-ным раствором трихлороуксусной кислоты. Восстановление дисульфидных связей проводят в присутствии денатурирующего агента, например 8 *M* мочевины или 6 *M* гуанидин-HCl, а затем алкилируют образующиеся остатки цистеина. Методы восстановления дисульфидных связей и последующего алкилирования рассматриваются в разд. 3.3 и в гл. 2.

При денатурации растворимость белков резко понижается, и, хотя ферментативный гидролиз нерастворимых субстратов особой проблемы не представляет, иногда обработка таких субстратов является сложной задачей. Для успешного ферментативного гидролиза нерастворимого белка полученный осадок следует по возможности перевести в тонкую суспензию. С этой целью белок переводят в раствор при экстремальном значении pH, а затем уже полученный раствор титруют до необходимого pH. Образец белка можно также растворить в 6 *M* гуанидин-HCl, который затем удаляется путем диализа. Если указанная обработка не дает удовлетворительных результатов, то белок солюбилизируют путем обратимой модификации по остаткам лизина, например с помощью цитраконилирования. В результате белок приобретает дополнительный заряд, что часто приводит к дезагрегации.

Некоторые протеолитические ферменты частично или полностью сохраняют свою активность в денатурирующих условиях, и, следовательно, их можно использовать при низких концентрациях мочевины, гуанидин-HCl или додецилсульфата натрия (ДСН). В ряде случаев для повышения растворимости увеличивают концентрацию буферного раствора или гидролиз ведут при повышенной температуре. Далее приводятся подробные сведения о ферментах, сохраняющих ферментативную активность в денатурирующих условиях или при повышенной температуре. Особое внимание уделяется трипсину, клострипаину, протеазе V8 из *S. aureus*, химотрипсину, термолизину и папаину.

3.3. Общие условия ферментативного гидролиза

Подбор оптимальных условий гидролиза осуществляют, варьируя четыре основных параметра: состав буфера, соотношение фермент : субстрат, температуру и время. Конкретные условия, в которых следует проводить гидролиз данным ферментом, при-

ведены в разделах, посвященных каждому ферменту. Однако предварительно необходимо сделать несколько замечаний общего характера.

3.3.1. Буферные растворы

Обычно используют летучие буферы, особенно в том случае, если полученные пептиды предполагают разделять с помощью ионообменной хроматографии или электрофореза на бумаге. Если дальнейшее разделение пептидов проводят методом ВЭЖХ, концентрация солей значения не имеет (гл. 6). Для большинства ферментов оптимальным диапазоном pH является 7,5—8,5. В этом диапазоне обычно используют 1%-ный (масс./об.) бикарбонат аммония (pH 7,9) и 100 мМ N-этилморфолинацетат. Гидролиз пепсином проводят в 10 мМ HCl или 5%-ной уксусной кислоте при pH 2,0. Для сохранения активности некоторых ферментов необходимо добавлять в реакционную смесь специфические реагенты, например сульфгидрильные реагенты (см. клострипаин и папаин) или ионы Ca^{2+} (см. термолизин).

3.3.2. Соотношение фермент: субстрат

Обычно ферментативный гидролиз проходит количественно при соотношении фермент : субстрат = 1 : 50÷100. Если требуется ограничить степень гидролиза, то соотношение увеличивают (до 1 : 1000). В то же время в некоторых случаях для достижения полноты гидролиза соотношение приходится уменьшать (до 1 : 10).

3.3.3. Температура

В большинстве случаев гидролиз проводят при 37 °С. Снижение температуры до 20 °С приводит к уменьшению скорости ферментативной реакции; этот прием используют с целью ограниченного протеолиза. Только два фермента — термолизин и протеаза из миксобактерий сохраняют высокую степень ферментативной активности при температуре >40 °С.

3.3.4. Продолжительность ферментативного гидролиза

Согласно литературным данным, для полного ферментативного гидролиза инкубацию с ферментом проводят в течение 2—4 ч. Сокращение продолжительности инкубации до 10 мин, как правило, приводит к гидролизу только нескольких связей, наиболее чувствительных к действию фермента. В случае некоторых

ферментов или особенно стабильных субстратов продолжительность гидролиза увеличивают до 16—24 ч. При этом с целью подавления микрофлоры в реакционную смесь следует добавить каплю толуола.

3.3.5. Контроль за процессом ферментативного гидролиза

В большинстве случаев ферментативный гидролиз проходит количественно и процесс не нуждается в специальном контроле. Иногда, при достаточном количестве материала, целесообразно вести контроль за скоростью реакции с помощью автоматического титратора. Однако, если требуется провести гидролиз по нескольким специфическим связям, необходимо подобрать условия гидролиза, в частности найти оптимальные температуру и время. В этом случае о степени гидролиза судят по молекулярной массе (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) образующихся фрагментов. Пример такого анализа приведен в работе [38].

3.3.6. Завершение ферментативной реакции

Ферментативная реакция может быть остановлена различными приемами, самый простой из которых — замораживание с последующим лиофильным высушиванием. Другим приемом является изменение pH, например подкисление, поскольку большинство ферментов в этих условиях теряют активность. В некоторых случаях, в особенности при проведении ограниченного протеолиза, реакцию целесообразно прерывать с помощью специфических ингибиторов. Сведения о специфических ингибиторах можно найти в соответствующих разделах, посвященных каждому ферменту. Известны три класса протеолитических ферментов: сериновые протеазы, сульфгидрильные протеазы и металлоферменты. Специфическими ингибиторами сериновых протеаз являются диизопропилфторофосфат (ДФФ) и фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ). Применение последнего предпочтительнее, поскольку ДФФ высоко токсичен. Обычно готовят 1 М растворы ДФФ в безводном пропандиоле и ФМСФ — в изопропаноле. Ферментативную реакцию останавливают добавлением ингибитора до достижения концентрации 1 ммоль/л. Гидролиз сульфгидрильными протеазами останавливают добавлением небольшого избытка алкилирующих агентов, например иодоуксусной кислоты, по отношению к сульфгидрильному реагенту, добавленному для активации фермента. Металлоферменты ингибируют добавлением хелатирующих реагентов, например 10 мМ ЭДТА.

3.4. Методы модификации белков

Перед протеолитическим гидролизом большинство белков необходимо модифицировать с помощью химических методов. Модификация сводится к расщеплению дисульфидных связей и далее в случае восстановления с последующим алкилированием позволяет получить стабильные производные цистеина. В случае аминоэтилирования модифицированные остатки цистеина служат дополнительными точками для расщепления исследуемого белка трипсином и протеазой из *A. mellea*. Иногда применяют модификацию остатков аспарагиновой кислоты, что также создает дополнительные участки для гидролиза трипсином.

Модификацию остатков лизина и аргинина используют с целью ограничения действия трипсина. Интерес представляют обратимые методы модификации, которые позволяют регенерировать исходные аминокислотные остатки после проведения ферментативного гидролиза.

3.4.1. Расщепление дисульфидных связей

3.4.1.1. Окисление. Расщепление дисульфидных связей путем окисления надмуравьиной кислотой приводит к получению стабильных остатков цистеиновой кислоты, а также к увеличению общего отрицательного заряда полипептидной цепи. Подробное обсуждение этого метода, а также практические рекомендации можно найти в разд. 2.2.3.

3.4.1.2. Восстановление. Методы восстановления дисульфидных связей подробно описаны в гл. 2 и в работе [55].

3.4.2. Алкилирование сульфгидрильных групп

Известно несколько алкилирующих реагентов, и выбор реагента зависит от свойств функциональной группы, которую необходимо ввести в полипептидную цепь. Далее обсуждаются три наиболее распространенных способа алкилирования.

3.4.2.1. Карбоксиметилирование. Карбоксиметилирование — наиболее общепринятый метод модификации сульфгидрильных групп белков. Для введения кислотных или нейтральных группировок в качестве реагентов используют иодоуксусную кислоту или иодоацетамид. Предварительно оба реактива перекристаллизовывают для удаления свободного иода. Иодоуксусную кислоту перекристаллизовывают из гексана, иодоацетамид — из петролейного эфира. Оба реагента добавляют в реакционную

смесь в небольшом избытке относительно общей концентрации сульфгидрильных групп. Раствор иодоуксусной кислоты перед использованием нейтрализуют с помощью триса или NaOH. Реакцию проводят при 0 °С в течение 1 ч. В этих условиях исключается возможность алкилирования других функциональных групп белка. Метод подробно обсуждается в работе [37] и в разд. 2.2.1.

Оба реактива доступны в виде радиоактивно меченных препаратов и могут использоваться для введения в полипептидную цепь радиоактивной метки. При введении метки вначале добавляют радиоактивный препарат (иодоуксусную кислоту или иодоацетамид), а затем небольшой избыток «холодного» реагента. При этом достигается наиболее высокая степень включения метки, так как известно, что реакционная способность сульфгидрильных групп значительно выше по сравнению с восстановителем, присутствующим в реакционной смеси.

3.4.2.2. Аминоэтилирование. S-Аминоэтильную группу вводят в полипептидную цепь с помощью алкилирования сульфгидрильных групп этиленимином [81, 82]. Этот тип модификации имеет большое значение, так как аминоэтилцистеин — аналог лизина, чувствительный к действию трипсина (разд. 3.5.1). Показано, что необходимо использовать восьмикратный избыток этиленимина в расчете на одну сульфгидрильную группу [12]. При низких pH наблюдается единственная побочная реакция алкилирования остатков метионина [91]. В связи с этим следует избегать подкисления реакционной смеси до полного удаления алкилирующего реагента. Более подробно метод рассматривается в гл. 2.

3.4.2.3. Другие реакции алкилирования. Для получения кислотоустойчивого остатка *S*-пиридилэтилцистеина используют 4-винилпиридин [26]. Применение в качестве алкилирующего реагента 2-бромоэтилтриметиламмонийбромида приводит к получению производного цистеина, также устойчивого в условиях кислотного гидролиза и в условиях автоматического секвенирования [45]. Более подробно метод рассматривается в гл. 2.

3.4.3. Модификация остатков лизина

Описано несколько методов модификации лизина, наибольший интерес из которых представляют цитраконилирование, малеилирование и трифтороацетилирование. Выбор метода зависит от относительной стабильности модифицированных групп при последующей обработке препаратов белка. Все три варианта модифицированного лизина устойчивы в диапазоне pH 8—9

Однако цитраконильные и малеильные производные неустойчивы в кислотных условиях, а трифтороацетильные — при высоких pH. Кроме указанных типов модификации следует упомянуть тетрафторосукцинилирование, которое приводит к получению производных лизина, неустойчивых в щелочной среде [8]. В связи с этим метод не нашел практического применения. Результаты изучения стабильности модифицированного лизина, степени регенерации аминогрупп и реконструкции нативной структуры и биологической активности исследуемых белков приведены в работе [2]. Из всех известных способов модификации остатков лизина наиболее предпочтительно цитраконилирование, поскольку в этом случае деблокирование проходит в мягких условиях и с высоким выходом при сохранении биологической активности исследуемого белка. К недостаткам метода относится высокая лабильность цитраконильных групп при 40 °C даже при pH 8,0. Если по условиям эксперимента белок необходимо выдерживать в указанных условиях в течение длительного времени, то более целесообразно использовать малеилирование. Еще одним недостатком обоих методов является возможность алкилирования свободных сульфгидрильных групп [9]. Если после деблокирования остатков лизина необходимо регенерировать сульфгидрильные группы, их предварительно переводят в *S*-сульфопроизводные, либо в смешанные дисульфиды (например, с цистеином).

3.4.3.1. Цитраконилирование. Для обратимой модификации остатков лизина в качестве реагента используют цитраконовый ангидрид [14]. Реакцию проводят при перемешивании и 20 °C, pH реакционной среды контролируют с помощью pH-метра. Белок (15 мг/мл) растворяют или суспендируют в воде и доводят pH до 8,0. К раствору небольшими порциями (1 мкл/мг белка) добавляют цитраконовый ангидрид и поддерживают pH 8,0 подтитровывая реакционную смесь 5 *М* NaOH. Через 30 мин pH реакционной среды не меняется, что свидетельствует о завершении реакции. Модифицированный белок подвергают диализу или гель-фильтрации в 0,1 *М* бикарбонате аммония. Большинство белков в результате модификации переходит в раствор. Однако в случае необходимости реакцию можно проводить в растворе мочевины или гуанидин-HCl.

Цитраконильные группы гидролизуют путем инкубирования при pH 3,5 и 20 °C в течение 12 ч. Скорость реакции деблокирования возрастает с уменьшением pH. Так, например, было предложено использовать для гидролиза диализ против 10 мМ HCl (pH 2,0) при 20 °C в течение 6 ч [30].

3.4.3.2. Малеилирование. На основании изучения условий малеилирования [9] было предложено проводить реакцию в карбо-

натном или фосфатном буферных растворах при 2 °С. Деблокирование проводят в более жестких условиях по сравнению с цитраконилированными белками. Период полупревращения защитных групп в реакции деблокирования при pH 3,5 и 37 °С составляет 11—12 ч. Деблокирование проводят обычно при pH 2,5 и 40 °С в течение 120 ч [24].

Методика [*10*]. Перед употреблением малеиновый ангидрид очищают возгонкой. 20 мг бычьего химотрипсиногена растворяют в 20 мл 0,1 *М* пирофосфатного буфера (pH 9,0), затем при 2 °С добавляют 300 мкл (6 порций по 50 мкл) 1,0 *М* раствора малеинового ангидрида в перегнанном диоксане. pH 9,0 поддерживают титрованием 0,1 *М* NaOH. Обессоливание проводят путем гель-фильтрации на колонке (3×40 см) с сефадексом G-25 в 0,01 *М* растворе аммиака. Для снятия малеильных групп раствор белка титруют муравьиной кислотой и аммиаком до pH 3,5 и раствор инкубируют при 37 °С в течение 30 ч, а затем при 60 °С в течение 60 ч.

Методика частичного малеилирования описана в разд. 4.4.6.2.

3.4.3.3. Трифтороацетилирование. Трифтороацетильную группу вводят с помощью S-этилтиолтрифтороацетата [33, 37]. Белок растворяют в воде или растворе мочевины и титруют до pH 10 1 *М* КОН. Раствор тщательно перемешивают, добавляют S-этилтиолтрифтороацетат (10 мкл/мг белка) и инкубируют при 20 °С, поддерживая pH с помощью 1 *М* КОН. Избыток реагента удаляют диализом.

Трифтороацетильные защитные группы гидролизуют в присутствии 1 *М* пиперидина при 0 °С в течение 2 ч. Затем pH доводят до 6 с помощью 0,5 *М* уксусной кислоты и избыток реагента удаляют путем лиофильного высушивания.

3.4.4. Модификация остатков аргинина

Для модификации остатков аргинина в белках предложен ряд реагентов, например малоновый ангидрид [53], циклогександион [105], 2,3-бутадион [121] нитромалоновый альдегид [95]. Сведения о некоторых способах модификации можно найти в работе [120]. К сожалению, в большинстве случаев реакцию проводят в жестких условиях (при экстремальных pH), что приводит к необратимой модификации остатков аргинина и сопровождается побочными реакциями. Далее приводится методика с использованием 1,2-циклогександиона [75]. Полученные производные аргинина устойчивы при кислотных pH, образуют комплекс с борат-ионом, устойчивый при pH 8. Методика описана в работе [98].

Модификация остатков аргинина 1,2-циклогександионом. Белок растворяют в 0,2 *М* Na-боратном буфере (pH 9,0; 10 мг/мл) и инкубируют с 0,15 *М* 1,2-циклогександионом при 35 °С в течение 2 ч. Подкисляют реакционную среду равным объемом 30%-ной уксусной кислоты, избыток реагента удаляют с помощью диализа против разбавленного раствора уксусной кислоты, диализат высушивают лиофильно. Согласно другому варианту методики, по завершении инкубации реакционную смесь диализуют против 0,1 *М* Na-боратного буфера (pH 8,0). В этом случае получают препарат, пригодный для ферментативного гидролиза.

Модифицированные остатки аргинина деблокируют путем инкубации при pH 7,0 в 0,5 *М* растворе гидроксиламина при 35 °С в атмосфере инертного газа в течение 12 ч.

3.4.5. Модификация карбоксильных групп белка

Модификацию карбоксильных групп в коротких пептидах осуществляют с помощью водорастворимого карбодиимида путем конденсации с соответствующими диаминами (1,2-диаминоэтаном или диаминометаном). При соответствующем выборе диамина остатки аспарагиновой кислоты превращаются в аналог лизина [112]. Реакцию конденсации пептида с 2 *М* диамином проводят при pH 4,75 в присутствии 0,4 *М* солянокислого 1-этил-3-(3-диэтиламинопропил)карбодиимида при 20 °С в течение 1 ч. Затем добавляют вторую порцию карбодиимида и инкубируют еще в течение 5 ч. Модифицированные пептиды отделяют от продуктов реакции и избытка реагентов путем гель-фильтрации. В результате происходит необратимая модификация всех карбоксильных групп белка. Возможности использования этого типа реакции для модификации высокомолекулярных белков не исследовались. Указанным способом был модифицирован 29-членный пептид глюкагон; это самый крупный пептид, подвергнутый такой модификации.

3.5. Протеазы с высокой специфичностью

В этом разделе приведены сведения о ферментах, обладающих довольно узкой специфичностью, т. е. расщепляющих ограниченное число пептидных связей. Свойства этих ферментов представлены в табл. 3.1. Из ферментов этого типа наиболее важное значение имеет трипсин. Область применения трипсина может быть существенно расширена с помощью реакций модификации, рассмотренных в предыдущем разделе. Благодаря таким модификациям можно вести гидролиз либо по остаткам лизина, либо по остаткам аргинина. В настоящее время все более широкое

применение находит протеаза V8 из *S.aureus*. При обработке этим ферментом присходит гидролиз пептидной связи остатков дикарбоновых кислот, главным образом глутаминовой кислоты, благодаря чему метод составляет серьезную конкуренцию расщеплению с помощью трипсина. Сравнительно недавно опубликованы данные о протеазе из мутанта *Pseudomonas fragi* [18]. Предварительные исследования свидетельствуют о том, что фермент гидролизует пептидную связь по аминогруппе остатков аспарагиновой или цистеиновой кислот. И хотя еще рано говорить о практическом применении этого фермента, вполне возможно, что он составит конкуренцию протеазе V8. Известны ферменты, специфичные в отношении остатков аргинина или лизина, однако они не нашли еще такого широкого применения, как трипсин. В целом эти ферменты расщепляют только часть предполагаемых пептидных связей, что в некоторых случаях является их несомненным преимуществом.

3.5.1. Трипсин

Одним из наиболее доступных высокоспецифичных ферментов, получивших широкое применение, является трипсин. Препараты трипсина получают из различных источников, однако иногда в них присутствует примесь химотрипсина. В этом случае следы химотрипсина ингибируют с помощью L-(1-тозиламидо-2-фенил)этилхлорометилкетона (ТФК) [57]. Рекомендуется использовать трипсин, обработанный ТФК, выпускаемый фирмой Worthington.

3.5.1.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. Трипсин специфически гидролизует пептидные связи по карбоксильной группе лизина и аргинина, т. е. типа -Lys-X- и -Arg-X-. Однако специфичность фермента не абсолютна, например фрагменты -Lys-Pro- и -Arg-Pro- устойчивы к действию трипсина. Присутствие кислотных остатков вблизи атакуемой связи приводит к резкому снижению скорости гидролиза, а в некоторых случаях полностью его исключает. Положительно заряженные группы также снижают скорость гидролиза. Например, если Arg и Lys находятся в ближайшем соседстве или расположены на N-конце полипептидной цепи, происходит лишь частичное расщепление пептидных связей.

В литературе приводится ряд примеров неспецифического действия трипсина, хотя такие случаи встречаются крайне редко. Чувствительными к действию фермента могут быть пептидные связи, расположенные вблизи ароматических или гидрофобных аминокислотных остатков. Показано, что такой тип гидролиза не связан с примесью химотрипсина, а является свойством

самого трипсина или присутствующего в виде примеси ψ-трипсина [52]. В ряде случаев наблюдается расщепление связей -Arg-Pro-, например во фрагментах -Trp-Arg-Pro-Ala- [74] и -Ala-Arg-Pro-Ala- [35]. Число полученных пептидов может не соответствовать общему количеству остатков аргинина и лизина (плюс один). Можно получить пептиды с остатком лизина или аргинина, расположенным не в С-концевом участке пептида. Однако такие случаи чрезвычайно редки. Таким образом, при интерпретации полученных результатов следует избегать поспешных выводов.

Условия гидролиза. Трипсин — это сериновая протеаза, обладающая максимальной активностью в диапазоне pH 7—9. Фермент обратимо инактивируется при pH<4. С целью предотвращения автолиза трипсин растворяют в 10 мМ HCl, после чего образец можно хранить в замороженном состоянии в течение нескольких недель. Гидролиз трипсином проводят в 0,1 М аммонийбикарбонатном буфере при соотношении фермент : субстрат=1 : 50÷100 при 37 °С в течение 1—4 ч. Гидролиз можно ограничить, используя в качестве субстрата нативный белок или снижая температуру и продолжительность инкубации. Так, например, при 25 °С в течение 30 мин в тропонине С наблюдается расщепление только 6 из 15 связей, чувствительных к трипсину [58].

Активность трипсина падает в денатурирующих условиях, например в присутствии 4 М мочевины сохраняется лишь 48% активности [39]. Удовлетворительные результаты получены при гидролизе трипсином в 2 М гуанидин-HCl [101]. Фермент необратимо инактивируется в присутствии ДФФ и ФМСФ. Известен также ряд специфических ингибиторов, например ингибитор из сои [4], который образует с трипсином стехиометрический комплекс и часто используется для остановки реакции [58]. При этом рекомендуется добавлять в реакционную смесь 4 мг ингибитора на 1 мг фермента. Гидролиз можно остановить подкислением; однако инактивация обратима, и при повышении pH активность фермента восстанавливается.

Специфическое расщепление по остаткам аргинина. Специфичность трипсина можно ограничить благодаря обратимому блокированию остатков лизина (разд. 3.4.3). В этом случае гидролиз проходит только по остаткам аргинина. Наиболее распространена модификация цитраконилированием; если продолжительность гидролиза трипсином слишком велика, используют малеилирование. Деблокирование малеильных или цитраконильных групп проводят подкислением реакционной смеси до pH<3,5, а затем осуществляют разделение полученных пептидов. При подкислении фермент инактивируется, однако для предотвращения его активации при последующем повышении

pH, рекомендуется отделять его от продуктов реакции или инактивировать необратимо. Если с модифицированными пептидами предполагается работать в кислой среде, то в пептид рекомендуется вводить трифтороацетильные группы.

Специфическое расщепление по остаткам лизина. При необходимости провести гидролиз белка только по остаткам лизина используют обратимую модификацию по остаткам аргинина [75] (разд. 3.4.4). Полученные пептиды фракционируют при низких pH, а затем снимают защитные группировки. При использовании этого метода получают воспроизводимые результаты [5, 122], однако в отдельных случаях после модификации наблюдается снижение растворимости белка, в особенности после лиофильного высушивания.

Специфическое расщепление по остаткам цистеина. Алкилирование остатков цистеина этиленимином приводит к получению аналога лизина — S-аминоэтилцистеина [81], и, таким образом, возникают дополнительные участки, чувствительные к действию трипсина. Скорость гидролиза по остаткам аминоэтилцистеина значительно ниже по сравнению с гидролизом по остаткам лизина и аргинина [12, 78]. При условии модификации остатков лизина и аргинина гидролиз трипсином проходит избирательно по остаткам цистеина. При этом стадия модификации остатков лизина и аргинина должна предшествовать восстановлению и последующему аминоэтилированию. Напротив, в случае цитраконилирования предварительно модифицируют сульфгидрильные группы белка. Кислотная природа защитных групп лизина и объемные боковые цепи модифицированных остатков аргинина препятствуют расщеплению трипсином, если один из этих остатков находится вблизи остатка аминоэтилцистеина.

Специфическое расщепление по остаткам аспарагиновой кислоты. Метод модификации карбоксильных групп диаминами [112] позволяет проводить гидролиз белка избирательно по остаткам аспарагиновой кислоты. При этом происходит модификация С-концевой и карбоксильных групп глутаминовой кислоты. В связи с этим маловероятно, что метод найдет практическое применение для гидролиза белков. Однако метод вполне применим для гидролиза коротких пептидов, содержащих ограниченное количество или вообще не содержащих глутаминовой кислоты.

3.5.2. Тромбин

Одним из наиболее специфичных и доступных ферментов является тромбин, и достойно удивления, что он до сих пор не нашел практического применения. По-видимому, ограниченный интерес к ферменту объясняется тем, что различные партии пре-

парата варьируют по степени очистки и активности. Тромбин выпускается рядом фирм: Calbiochem, Miles Lab., Sigma. Описан метод дополнительной очистки коммерческого препарата тромбина на СП-сефадексе G-50 [106]. Подробное описание методов определения активности и идентификации различных молекулярных форм тромбина приведено в работе [64].

3.5.2.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. Гидролиз тромбином проходит по С-концевой пептидной связи остатков аргинина типа -Arg-X-. В нативном субстрате фибриногене этой связью является -Arg-Gly-, в других белках в качестве остатка X может быть аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, цистеин, валин [64]. Наблюдается также гидролиз по связи -Arg-His- в кальмодулине [108]. Обработка тромбином приводит к расщеплению только очень ограниченного числа пептидных связей аргинина, и, следовательно, этот метод можно считать идеальным для получения крупных фрагментов белка, предназначенных для автоматического секвенирования. В некоторых случаях тромбин даже в жестких условиях гидролизует в белке только одну пептидную связь, в других случаях степень гидролиза зависит от продолжительности реакции и температуры. Соответствующие примеры приведены в работе [106].

Условия гидролиза. Тромбин — сериновая протеаза; проявляет максимум активности при pH 8,0. Гидролиз проводят в условиях, аналогичных трипсину, т. е. в 100 м*М* NH_4HCO_3 при 37 °С в течение 4—8 ч, но два последних параметра могут варьировать в широких пределах. Активность тромбина определяют по степени свертывания фибриногена в условных единицах NIH (введенных National Institutes of Health, США) [64]. Соотношение фермент : субстрат также варьирует в широком диапазоне: от 1 : 100 до 1 : 5 [46, 70] и от 1 до 60 ед./мг субстрата [59, 118]. В связи с этим в каждом конкретном случае следует подбирать оптимальные условия гидролиза, например, осуществляя контроль за процессом гидролиза с помощью электрофореза. Соответствующие примеры приведены в работе [71]. Тромбин ингибируется ДФФ и ФМСФ.

3.5.3. Протеаза V8 из *Staphylococcus aureus*

Протеазу V8 выделяют из штамма V8 S. aureus [43]; она поставляется как коммерческий препарат фирмой Miles, ферменты с аналогичной специфичностью выделены из штамма 8325N *St. aureus* [83] и из сорго [28, 29], но они не выпускаются в виде коммерческих препаратов.

Специфичность. Фермент проявляет специфичность в основном к С-концевой пептидной связи глутаминовой кислоты типа -Glu-X-, где в качестве X может быть любой аминокислотный остаток, кроме пролина и глутаминовой кислоты. Показано, что субстратная специфичность зависит от состава буферных растворов [17]. Так, например, в 50 мМ ацетате аммония (рН 4,0) или 50 мМ NH_4HCO_3 (рН 7,8) фермент характеризуется высокой специфичностью, в то время как в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,8) происходит гидролиз по остаткам глутаминовой и аспарагиновой кислот. По другим данным [3], в фосфатном буфере иногда наблюдается увеличение скорости гидролиза. Различие в специфичности можно объяснить тем, что скорость гидролиза по остаткам аспарагиновой кислоты в фосфатном буфере значительно выше, чем в ацетатном или бикарбонатном буферах. Известно также, что связи, соседние с S-карбоксиметилцистеином не чувствительны к действию фермента [119].

Особого внимания заслуживают работы, посвященные изучению протеазы V8 [21—23, 107]. Согласно литературным данным, при обработке протеазой V8 иногда наблюдается неспецифический гидролиз ряда связей, главным образом связи -Ser-X-. Однако в большинстве случаев протеаза V8 селективно гидролизует пептидные связи остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот [116]. Иногда наблюдается только частичный гидролиз чувствительных к действию фермента связей, особенно если в коротком фрагменте содержится несколько остатков глутаминовой кислоты.

Условия гидролиза. Протеаза V8 сохраняет активность в диапазоне рН 3,5—9,5 [17], причем максимальная активность наблюдается при рН 4,0 и 7,8 [43]. Эта сериновая протеаза ингибируется ДФФ. Фермент активен в 0,2%-ном ДСН и сохраняет 50% активности в 4М мочевине [17]. Таким образом, гидролиз протеазой можно проводить в денатурирующих условиях, когда необходимо солюбилизировать субстрат. В литературе нет прямых доказательств того, что связывание ДСН с субстратом влияет на активность фермента. Гидролиз проводят в 50 мМ ацетате аммония (рН 4,0) при 37 °С, причем продолжительность гидролиза может достигать 18 ч [43]. Однако в зависимости от требуемой специфичности фермента гидролиз осуществляют при рН 7,8 в 50 мМ NH_4HCO_3 или 50 мМ натрийфосфатном буфере.

3.5.4. Клострипаин

Сульфгидрильная протеаза клострипаин выделена из *Clostridium histolyticum* [68]. Подробную информацию об использовании этого фермента можно найти в работе [67]. Фермент выпу-

скается в виде коммерческого препарата фирмами Worthington и Boehringer. Сравнительно недавно предложен метод дополнительной очистки этих препаратов методом аффинной хроматографии на ω-аминоалкилагарозе (сефароза-C_7NH_2) [31]. Метод позволяет получить высокоактивный препарат, немного отличающийся от известного ранее. Перед употреблением рекомендуется подвергать коммерческий препарат клострипаина дополнительной очистке с помощью указанного метода.

3.5.4.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. В основном специфичность клострипаина сводится к гидролизу С-концевой пептидной связи по остаткам аргинина (связь типа -Arg-X-), хотя иногда наблюдается гидролиз отдельных связей -Lys-X-. Степень гидролиза по остаткам лизина можно ограничить, варьируя условия. Так, например, были найдены условия гидролиза 20-членного фрагмента лизоцима по двум остаткам аргинина, при сохранении пептидной связи остатка лизина [93], а также β_2-гликопротеина I человека [61] по остаткам аргинина и отдельным остаткам лизина. Описан [103] гидролиз фрагмента дигидрофолатредуктазы (полученного при расщеплении белка под действием BrCN) по остаткам аргинина с сохранением пептидной связи остатков лизина. Выход пептидов, полученных в результате гидролиза по остаткам аргинина, составляет 40—100%. Аналогичные результаты получены при гидролизе фрагмента фосфоглицераткиназы лошади (полученного при расщеплении белка под действием BrCN). В этом случае клострипаин гидролизует фрагмент белка по трем остаткам аргинина, не затрагивая пяти пептидных связей остатков лизина. Специфичность препарата клострипаина, дополнительно очищенного методом аффинной хроматографии, исследована на примере парвальбумина хека, содержащего один остаток аргинина и 12 остатков лизина. Инкубация белка при 37 °С в течение 12 ч приводит к гидролизу по остатку аргинина. Имеются данные [19, 69], что фермент проявляет аналогичную специфичность в отношении других объектов. Таким образом, специфичность клострипаина аналогична действию трипсина на белки с модифицированными остатками лизина. На практике метод гидролиза клострипаином обладает определенными преимуществами, поскольку при этом исключаются стадии модификации и деблокирования остатков лизина.

Условия гидролиза. Клострипаин проявляет максимум активности при pH 7,7 в присутствии сульфгидрильных реагентов [68]. Целесообразно проводить гидролиз в присутствии ионов Ca^{2+}, хотя их присутствие не обязательно. Гидролиз проводят при соотношении фермент : субстрат = 1 : 50 в 100 мМ NH_4HCO_3 и 1 мМ дитиотреите при 25 °С в течение 4 ч. Рекомендуется

предварительно активировать фермент в 10 мМ ДТТ и 20 мМ NH_4HCO_3 в течение 1 ч, а затем инкубировать раствор белка при соотношении фермент : субстрат = 1 : 200 в 50 мМ NH_4HCO_3 при 37 °С в течение 12 ч [31]. Температуру раствора и продолжительность гидролиза варьируют в зависимости от поставленных задач. С целью солюбилизации субстрата в некоторых случаях в реакционную смесь добавляют 2 М мочевину [93].

3.5.5. Протеаза подчелюстной железы

Фермент выделен из подчелюстной железы мыши [86, 87]. Максимум активности наблюдается при pH 7,5—8,0. Подробную информацию о свойствах этого фермента можно найти в работе [6]. Показано, что эта сериновая протеаза ингибируется ДФФ, гомологична тромбину [89, 90]. Аналогичные результаты опубликованы в работе [104]. Фермент выпускается в виде коммерческого препарата фирмами Pierce и Boehringer.

3.5.5.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. Изучение действия фермента на различные синтетические и нативные субстраты показало, что фермент специфичен к С-концевой пептидной связи остатков аргинина [88]. На примере гидролиза яичного лизоцима и инсулина быка показано, что гидролиз проходит по некоторым остаткам аргинина и не затрагивает остатки лизина. Аналогичные результаты получены при гидролизе κ-цепи иммуноглобулина [113]. При этом идет гидролиз по большинству остатков аргинина, за исключением устойчивых пептидных связей -Arg-Val- и -Arg-Arg. Таким образом, по специфичности фермент аналогичен клострипаину. Однако при обработке фосфатидилхолинсвязывающего белка из печени быка наблюдается расщепление только по одному из 10 остатков аргинина [69].

Условия гидролиза. Гидролиз проводят в 1% NH_4HCO_3 (pH 8,0) при 37 °С в течение различных периодов времени (до 24 ч) при соотношении фермент : субстрат = 1 : 50. Гидролиз останавливают подкислением HCl до pH 1,5—2,0 [88].

3.5.6. Протеаза из *Armillaria mellea*

Фермент выделен из базидиомицета *Armillaria mellea* [110] и получен в виде активного препарата [60, 110, 111]. Показано, что фермент представляет собой металлопротеин (Zn^{2+}-содержащий) с молекулярной массой 14 000 и с максимумом активности при pH 6,8. Фермент не выпускается в виде коммерческого препарата.

3.5.6.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. При изучении специфичности фермента было показано, что гидролиз проходит по N-концевой пептидной связи остатков лизина и аминоэтилцистеина (Aec) типа -X-Lys- и -X-Aec-, даже если X=Pro. Расщепление связи -Pro-Lys наблюдали при обработке инсулина и других субстратов [16, 36]. Было также показано, что пептидные связи, содержащие вблизи остатков лизина кислотные остатки, устойчивы к действию фермента. В некоторых случаях наблюдается гидролиз С-концевой пептидной связи аргинина -Arg-X. Степень гидролиза по этой связи возрастает, если X=Leu или Ile, хотя не все фрагменты этого типа подвергаются гидролизу.

Фермент из *A. mellea* использовали для ограниченного гидролиза иммуноглобулинов G и D [44, 48]. Результаты этих исследований свидетельствуют о его высокой специфичности.

Условия гидролиза. Гидролиз проводят в 0,2 *М* N-этилморфолин — ацетатном буфере (pH 8,0) при соотношении фермент : : субстрат=1 : 100 при 35 °С в течение 22 ч [15] или в 0,1 *М* NH_4HCO_3 при соотношение фермент : субстрат=1 : 500÷1000 при 37 °С [36]. Удовлетворительные результаты получены при проведении реакции в диапазоне pH 4—9 и при повышении температуры до 50 °С. Оптимальные результаты получены при обработке субстратов в 10 м*М* трис — HCl-буфере (pH 7,0), содержащем 0,15 *М* NaCl и 2 м*М* ацетат кальция, при соотношении фермент : субстрат=1 : 100 при 37 °С в течение 3 ч [44]. Фермент ингибируется в присутствии ЭДТА, а также 1 м*М* раствором лизина или цистеина [111].

Специфическое расщепление по остаткам цистеина. На примере β-цепи гемоглобина человека и токсина яда пчелы было показано, что фермент из *A. mellea* можно использовать для специфического гидролиза по остаткам аминоэтилцистеина [15]. После модификации остатков лизина путем трифтороацетилирования проводили алкилирование указанных белков по SH-группам с помощью этиленимина. При обработке ферментом наблюдался специфический гидролиз по всем остаткам аминоэтилцистеина за исключением фрагментов -Aec-Lys- и -Lys-Aec-.

3.5.7. Протеаза II из *Myxobacter* AL1 [117]

Подробная характеристика этого фермента приведена в работе [47]. Фермент не выпускается в виде коммерческого препарата.

3.5.7.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. Протеаза II проявляет специфичность к N-концевой пептидной связи остатков лизина, аналогично про-

теазе из *A. mellea* [117]. Показано, что гидролиз пеницилло-пепсина IV в течение 1 ч приводит к расщеплению только по остаткам лизина [13], а гидролиз алкогольдегидрогеназы в течение 4 ч — к расщеплению с аналогичной специфичностью включая гидролиз связи -Pro-Lys- [49]. При этом не идет гидролиз пептидных связей остатков аргинина, хотя в отдельных случаях отмечается неспецифический гидролиз других пептидных связей. Неспецифический гидролиз можно исключить путем уменьшения времени инкубации. Протеаза II гидролизует обе связи -Gly-Lys- фрагмента дигидрофолатредуктазы, полученного после расщепления белка под действием BrCN, с сохранением пептидной связи остатков аргинина [25].

Сравнительный анализ продуктов гидролиза пенициллопепсина IV ферментами из *A. mellea* и *Myxobacter* показал, что последний является более специфичным.

Условия гидролиза. Фермент из *Myxobacter* проявляет максимум активности при pH 8,5—9,0, характеризуется устойчивостью к автолизу, термостабильностью при 60 °C и ингибируется в присутствии 50 м*M* ЭДТА [117]. Гидролиз проводят в 20 м*M* трис-HCl-буфере (pH 9,0) при 37 °C в течение 4 ч при соотношении фермент : субстрат = 1 : 100 [49].

3.5.8. Постпролинспецифичный фермент

Поскольку остаток пролина в структурном отношении принципиально отличается от других аминокислотных остатков и вместе с тем относится к природным аминокислотам и входит в состав многих белков, можно было рассчитывать, что в природе существует фермент, расщепляющий соответствующие пептидные связи. Подобный фермент представлял бы несомненный интерес, поскольку пролин — редкая аминокислота и его присутствие ограничивает возможность атаки соседних пептидных связей другими протеолитическими ферментами. До настоящего времени выделен только один постпролинспецифичный фермент [54]. Выделение и очистку этого фермента из почек ягненка проводили методом аффинной хроматографии. По предварительным данным фермент относится к классу сериновых протеаз [123]. Подробная характеристика фермента приведена в работах [109, 124]. Фермент не выпускается в виде коммерческого препарата.

3.5.8.1. Специфичность и условия гидролиза. На примере гидролиза коротких пептидов, содержащих не более 13 аминокислотных остатков, показано, что фермент гидролизует все типы связей -Pro-X- за исключением -Pro-Pro- [54]. Скорость гидролиза зависит от природы остатка X: максимальная скорость наблю-

дается, если X обладает гидрофобными свойствами, минимальная при кислотных или основных свойствах. Показано также, что фермент гидролизует связи -Ala-X-, но скорость гидролиза составляет 1/100 : 1/1000 скорости гидролиза связи -Pro-X-. При инкубации октапептида наблюдался ограниченный гидролиз связи -Pro-Thr- [20], в то время как обработка 22- и 33-членных пептидов в течение 36 ч приводила к расщеплению только 10—20% связей, чувствительных к действию фермента [23]. Полученнные данные свидетельствуют о том, что фермент можно использовать только для гидролиза коротких пептидов.

Условия гидролиза. Фермент проявляет максимум активности в диапазоне pH 7,5—8,0. Гидролиз проводят в 100 мМ NH_4HCO_3 (pH 7,8), содержащем 1 мМ ДТТ и 1 мМ ЭДТА при 22 °C в течение 24 ч.

3.6. Протеазы с низкой специфичностью

В этом разделе приводятся сведения о важных в практическом отношении ферментах (свойства которых приведены в табл. 3.2), обладающих более широкой специфичностью. Охвачены далеко не все ферменты, однако рассмотрены большинство протеаз с широкой специфичностью. Многие из них гидролизуют пептидные связи, соседние с гидрофобными аминокислотными остатками. Рассмотрены также ферменты, такие, как пепсин и папаин, поскольку они часто используются с целью ограниченного протеолиза нативных белков.

3.6.1. Химотрипсин

Химотрипсин — один из наиболее специфичных ферментов, которые обсуждаются в этом разделе; он широко применяется для получения первичных гидролизатов [50, 56, 99].

Специфичность. Химотрипсин в основном гидролизует C-концевую пептидную связь ароматического или объемного гидрофобного остатка типа -H-X-, где X=Tyr, Phe, Trp или Leu. Связи -H-Pro- устойчивы к действию фермента. Химотрипсин проявляет более широкую специфичность по сравнению с трипсином, так как может расщеплять пептидные связи других аминокислотных остатков, например Leu, His, Ile, Met, Ser и Val.

Условия гидролиза. Гидролиз проводят в условиях, аналогичных гидролизу трипсином: в 100 мМ NH_4HCO_3, соотношение фермент : субстрат=1 : 50, 37 °C, 4 ч. Иногда используют буфер

с pH 7,0, содержащий 2М гуанидин-HCl [101]. Химотрипсин является сериновой протеазой и ингибируется ДФФ и ФМСФ. Наличие примеси трипсина в препаратах химотрипсина встречается редко. При необходимости действие трипсина можно исключить, добавляя в реакционную смесь соевый ингибитор трипсина (разд. 3.5.1.1).

3.6.2. Термолизин

Термолизин выделяют из *Bacillus thermoproteolyticus*. Фермент находит чрезвычайно широкое применение в работах по определению аминокислотной последовательности белков. Термолизин выпускается в виде коммерческого препарата фирмой Calbiochem и некоторыми другими. Подробную информацию о применении этого фермента можно найти в работах [41, 65].

3.6.2.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. Фермент гидролизует N-концевые пептидные связи гидрофобных аминокислотных остатков типа -X-H-, где в большинстве случаев H=Val, Leu, Ile, Phe, Tyr или Trp. Однако специфичность этого фермента значительно шире, так как фермент гидролизует с достаточно высокой скоростью пептидные связи аланина. Довольно редко наблюдается гидролиз по остаткам Asn, Thr, His и Gly. Из множества работ, посвященных исследованию специфичности термолизина, особого внимания заслуживают работы [1, 41]. Фрагмент Pro-Ile- чувствителен к действию фермента, а в последовательности типа -X-Phe-Pro- связь -X-Phe-устойчива. Гидролиз термолизином ингибируется соседними α-амино- или карбоксильными группами, следовательно, фермент не обладает экзопептидазной активностью. Амино- и карбоксильные группы боковых цепей аминокислотных остатков не оказывают заметного влияния на специфичность фермента.

Условия гидролиза. Термолизин проявляет активность в диапазоне pH 7,0—8,0, требует присутствия ионов Ca^{2+}. Гидролиз проводят в 100 мМ NH_4HCO_3, содержащем 5 мМ $CaCl_2$. Большинство препаратов фермента содержит значительное количество Ca^{2+}, которого в принципе достаточно для проявления ферментативной активности. Фермент ингибируется в присутствии ЭДТА. Обработка белков при 37 °С в течение 4 ч при соотношении фермент : субстрат = 1 : 50 позволяет получить удовлетворительные результаты, хотя иногда требуется провести дополнительные исследования для подбора оптимальных условий. Термолизин термостабилен, сохраняет 100% активности при инкубации при 60 °С в течение 1 ч и значительную часть — при 80 °С [65]. Фермент устойчив в 8 М мочевине, а также

в 20%-ном этаноле или метаноле, однако в этих условиях повышается вероятность термической денатурации фермента и вследствие этого гидролиз следует проводить при 20 °С.

3.6.3. Пепсин

Подробную информацию о каталитической активности и использовании пепсина можно найти в работах [11, 27]. Этот фермент — практически единственная широко изученная и доступная в виде коммерческого препарата кислая протеаза (наряду с протеазой V8 из *S. aureus*).

3.6.3.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. Пепсин специфичен главным образом к пептидным связям ароматических и объемных алифатических аминокислотных остатков. Связи, включающие глутаминовую кислоту, также чувствительны к действию фермента. К сожалению, пепсин характеризуется широкой специфичностью к ряду других пептидных связей, поэтому окончательный результат частичного гидролиза предсказать трудно. Фермент применяется с целью ограниченного протеолиза нативных белков. Так, например, обработка пепсином при pH 4,5—5,0 приводит к получению крупных фрагментов иммуноглобулинов [73].

Условия гидролиза. Пепсин проявляет активность в диапазоне pH 1—5 (оптимальные условия pH 2,0). Гидролиз проводят в 10 мМ HCl или 5%-ной уксусной кислоте. Фермент необратимо ингибируется при pH>6,0. Наиболее удачные результаты дает применение пепсина при определении положения дисульфидных связей, так как дисульфидный обмен минимален именно при низких pH; инкубация с пепсином приводит к получению коротких пептидов с правильно замкнутыми дисульфидными связями [101] (см. также разд. 4.4.2).

3.6.4. Папаин

Папаин — SH-фермент, выделенный из латекса дынного дерева. Подробную информацию о свойствах этого фермента можно найти в работе [32]. Фермент выпускается рядом фирм.

3.6.4.1.Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. Субстратная специфичность папаина подробно изучена в работе [85]. Показано, что фермент содержит достаточно протяженный участок связывания, причем гидролиз специфической связи происходит в результате взаимодействия с одним из фрагментов этого участка. Участок связывания обладает повышенным сродством к двум последовательно распо-

ложенным остаткам фенилаланина в субстрате [32]. В целом папаин гидролизует самые разнообразные пептидные связи, и, следовательно, результат гидролиза практически непредсказуем.

Папаин применялся для получения крупных фрагментов нативных белков, например иммуноглобулинов [79], миозина [63], экстрацеллюлярного фрагмента антигенов гистосовместимости человека [80].

Условия гидролиза. Папаин проявляет максимум активности в диапазоне pH 5—7,5, причем активацию фермента проводят в присутствии сульфгидрильных реагентов. Гидролиз проводят в 0,2 *М* пиридин-ацетатном буфере (pH 6,5), содержащем 1% (по объему) 2,3-димеркаптопропан-1-ола, в течение 1 ч при 37 °C и соотношении фермент : субстрат = 1 : 50 (по объему) [84]. Папаин легко инактивируется при окислении в присутствии низких концентраций цистеина, солями тяжелых металлов или цианат-ионами [97]. Папаин устойчив в присутствии мочевины, причем активность сохраняется даже в 8 *М* растворе мочевины, однако раствор последней должен быть тщательно деионизирован, чтобы исключить инактивирующее действие цианат-ионов.

3.6.5. Эластаза

Эластаза — сериновая протеаза, гомологичная химотрипсину и трипсину. Подробное описание свойств фермента приведено в работе [40]. Эластаза выпускается несколькими фирмами.

3.6.5.1. Специфичность и условия гидролиза.

Специфичность. Эластаза характеризуется широкой специфичностью. В основном фермент гидролизует С-концевые пептидные связи аминокислотных остатков с небольшой гидрофобной боковой цепью, например аланина [40]. При изучении специфичности эластазы обнаружен гидролиз пептидных связей, соседних с остатками нейтральных аминокислот [72]. При обработке окисленных цепей инсулина наблюдали расщепление по остаткам Ser, Ala, Gly, Val и Leu.

Условия реакции. Гидролиз проводят в условиях, аналогичных трипсину и химотрипсину, т. е. в 100 м*М* NH_4HCO_3 при 37 °C в течение 1—4 ч при соотношении фермент : субстрат = = 1 : 50.

3.6.6. α-Протеаза из *Crotalus atrox*

α-Протеазу выделяют из яда *Crotalus atrox.* Свойства фермента приведены в работах [77, 125]. Фермент гидролизует N-концевые пептидные связи гидрофобных аминокислотных остатков

[77, 66] и, таким образом, по специфичности аналогичен термолизину. α-Протеаза проявляет максимум активности в диапазоне pH 7,5—8,0; она иногда используется при определении первичной структуры белков [107]. Однако для выявления всех преимуществ этого фермента необходимо провести дополнительные исследования. Фермент выпускается в виде коммерческого препарата фирмой Pierce.

3.6.7. α-Литическая протеаза из *Sorangim sp.*

Выделение α-литической протеазы описано в 1965 г. [114]. В виде коммерческого препарата фермент не выпускается. По специфичности фермент аналогичен эластазе. Предполагают, что α-литическая протеаза более специфична [115], но прямого сопоставления двух ферментов сделано не было. Сравнительно недавно фермент был использован в ряде исследований [100—103].

3.7. Заключение

Основное внимание в этой главе уделено методам получения крупных фрагментов белка и соответственно методам ограниченного гидролиза с использованием ферментов, обладающих высокой специфичностью. Использование таких методов играет существенную роль как в определении аминокислотной последовательности белков, так и в структурно-функциональных исследованиях. Наиболее специфические протеазы гидролизуют полипептидную цепь по основным аминокислотным остаткам — Lys и Arg или по кислотным — Glu. Другие ферменты обладают более широкой специфичностью к гидрофобным аминокислотным остаткам. Тем не менее такие ферменты нашли широкое применение при дополнительном гидролизе крупных фрагментов белка. В этой главе описаны также свойства протеазы, гидролизующей по остаткам пролина. Этот фермент представляет несомненный интерес, но в настоящее время еще не получил широкого применения. Следует надеяться, что возможности аналитической химии белка будут расширяться в дальнейшем благодаря выпуску новых коммерческих препаратов из числа описанных в этой главе и открытию новых высокоспецифичных ферментов.

Литература

1. *Ambler R. P., Meadway R. J.*, Biochem. J., **108**, 893—895 (1968).
2. *Atassi M. Z., Habeeb A. F. S. A.*, Methods Enzymol., **25**, 546—553 (1972).
3. *Austen B. M., Smith E. L.*, Biochem. Biophys. Res Commun., **72**, 411—417 (1976).

4. *Birk Y.*, Methods Enzymol., **45**, 700—707 (1976).
5. *Blumenthal K. M., Moon K., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., **250**, 3644—3654 (1975).
6. *Boesman M., Levy M., Schenkein I.*, Arch. Biochem. Biophys., **175**, 463—476 (1976).
7. *Boyer P. D.* (Ed.), Enzymes, 3rd edn., vol. 3, Academic Press, New York, London, 1971.
8. *Braunitzer G. von, Beyreuther K., Fujiki H., Schrank B.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **349**, 265 (1968).
9. *Butler P. J. G., Hartley B. S.*, Methods Enzymol., **25**, 191—199 (1972).
10. *Butler P. J. G., Harris J. I., Hartley B. S., Leberman R.*, Biochem. J., **112**, 679—689 (1969).
11. *Clement G.*, In: Progress in Bioorganic Chemistry, Kaiser E. T., Kézdy F. J. (Eds.), vol. 2, Wiley, New York, London, Sydney, Toronto, 1973, pp. 177—238.
12. *Cole R. D.*, Methods Enzymol., **11**, 315—317 (1967).
13. *Cunningham A., Wang H.-M., Jones S. R., Kurosky A., Rao L., Harris C. I., Rhee S. H., Hofmann T.*, Can. J. Biochem., **54**, 902—914 (1976).
14. *Dixon H. B. F., Perham R. N.*, Biochem. J., **109**, 312—314 (1968).
15. *Doonan S., Fahmy H. M. A.*, Eur. J. Biochem., **56**, 421—426 (1975).
16. *Doonan S., Doonan H. J., Hanford R., Vernon C. A., Walker J. M., Airoldi L. P. da S., Bossa F., Barra D., Carloni M., Fassela P., Riva F.*, Biochem. J., **149**, 497—506 (1975).
17. *Drapeau G. R.*, Methods Enzymol., **47**, 189—191 (1977).
18. *Drapeau G. R.*, J. Biol. Chem., **255**, 839—840 (1980).
19. *Drickamer K.*, J. Biol. Chem., **256**, 5827—5839 (1981).
20. *Eerd J.-P. van, Capony J.-P., Ferraz C., Pechère J.-F.*, Eur. J. Biochem., **91**, 231—242 (1978).
21. *Emmens M., Welling G. W., Beintema J. J.*, Biochem. J., **157**, 317—323 (1976).
22. *Evanberg A., Meyer H., Gaastra W., Verheij H. M., Haas G. H. de*, J. Biol. Chem., **252**, 1189—1196 (1977).
23. *Fleer E. A. M., Verheij H. M., Haas G. H. de*, Eur. J. Biochem., **82**, 261—269 (1978).
24. *Freedlender E. F., Haber E.*, Biochemistry, **11**, 2362—2370 (1972).
25. *Freisheim J. H., Bitar K. G., Reddy A. V., Blankenship D. T.*, J. Biol. Chem., **253**, 6437—6444 (1978).
26. *Friedman M., Krull L. H., Cavins J. F.*, J. Biol. Chem., **245**, 3868—3871 (1970).
27. *Fruton J. S.*, In: Enzymes, 3rd edn., vol. 3, Boyer P. D. (Ed.), Academic Press, New York, London, 1971, pp. 119—164.
28. *Garg G. K., Virupaksha T. K.*, Eur. J. Biochem., **17**, 4—12 (1970).
29. *Garg G. K., Virupaksha T. K.*, Eur. J. Biochem., **17**, 13—18 (1970).
30. *Gibbons I., Perham R. N.*, Biochem. J., **116**, 843—849 (1970).
31. *Gilles A. M., Imhoff J.-M., Keil B.*, J. Biol. Chem., **254**, 1462—1468 (1979).
32. *Glazer A. N., Smith E. L.*, In: Enzymes, 3rd edn, vol. 3, Boyer P. D. (Ed.), Academic Press, New York, London, 1971, pp. 501—546.
33. *Goldberger R. F.*, Methods Enzymol., **11**, 317—322 (1967).
34. *Goldberger R. E., Anfinsen C. B.*, Biochemistry, **1**, 401—405 (1962).
35. *Grand R. J. A., Wilkinson J. M., Mole L. E.*, Biochem. J., **159**, 633—641 (1976).
36. *Gregory H.*, FEBS Lett., **51**, 201—205 (1975).
37. *Gurd F. R. N.*, Methods Enzymol., **25**, 424—438 (1972).
38. *Hale G., Perham R. N.*, Eur. J. Biochem., **94**, 119—126 (1979).
39. *Harris J. I.*, Nature (Lond.), **177**, 471—473 (1956).
40. *Hartley B. S., Shotton D. M.*, In: Enzymes, 3rd edn., vol. 3, Boyer P. D. (Ed.), Academic Press, New York, London, 1971, pp. 323—373.

41. *Heinrikson R. L.*, Methods Enzymol., **47**, 175—189 (1977).
42. *Hill R. L.*, Adv. Protein Chem., **20**, 37—107 (1965).
43. *Houmard J., Drapeau G. R.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 3506—3509 (1972).
44. *Hunneyball I. M., Stanworth D. R.*, Immunology, **29**, 921—931 (1975).
45. *Itano H. A., Robinson E. A.*, J. Biol. Chem., **247**, 4819—4824 (1972).
46. *Iwanaga S., Wallén P., Gröndahl N. J., Henschen A., Blombäck B.*, Eur. J. Biochem., **8**, 189—199 (1969).
47. *Jackson R. L., Matsueda G. R.*, Methods Enzymol., **19**, 591—599 (1970).
48. *Jefferis R., Matthews J. B.*, Immunochemistry, **14**, 171—178 (1977).
49. *Jörnvall H.*, Eur. J. Biochem., **72**, 425—442 (1977).
50. *Kasper C. B.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), 2nd edn., Springer, Heidelberg, Berlin, New York, 1975, pp. 114—161.
51. *Keil B.*, In: Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Second Internat. Conf., Previero A., Coletti-Previero M.-A. (Ed.), North Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1977, pp. 287—292.
52. *Keil-Dlouhá V., Zylba N., Imhoff J.-M., Tong N.-T., Keil B.*, FEBS Lett., **16**, 291—295 (1971).
53. *King T. P.*, Biochemistry, **5**, 3454—3459 (1966).
54. *Koida M., Walter R.*, J. Biol. Chem., **251**, 7593—7599 (1976).
55. *Konigsberg W.*, Methods Enzymol., **25**, 185—188 (1972).
56. *Konigsberg W. H., Steinman H. M.*, In: The Proteins, Neurath H., Hill R. L. (Eds.), 3rd edn., vol. 3, Academic Press, New York, 1977, pp. 1—178.
57. *Kostka V., Carpenter F. H.*, J. Biol. Chem., **239**, 1799—1803 (1964).
58. *Leavis P. C., Rosenfeld S. S., Gergely J., Grabarek Z., Drabikowski W.*, J. Biol. Chem., **253**, 5452—5459 (1978).
59. *Leavis P. C., Rosenfeld S., Lu R. C.*, Biochim. Biophys. Acta, **535**, 281—286 (1978).
60. *Lewis W. G., Basford J. M., Walton P. L.*, Biochim. Biophys. Acta, **522**, 551—560 (1978).
61. *Liu Y.-S., Putnam F. W.*, Fed. Proc. Fed. Amer, Soc. Exp. Biol., **36**, 763 (1977).
62. *Lorand L.* (Ed.), Methods Enzymol., **45**, 1—939 (1976).
63. *Lowey S., Slayter H. S., Weeds A. G., Baker H.*, J. Mol. Biol., **42**, 1—29 (1969).
64. *Lundblad R. L., Kingdon H. S., Mann K. G.*, Methods Enzymol., **45**, 156—176 (1976).
65. *Matsubara H.*, Methods Enzymol., **19**, 642—651 (1970).
66. *Mella K., Volz M., Pfleiderer G.*, Anal. Biochem., **21**, 219—226 (1967).
67. *Mitchell W. M.*, Methods Enzymol., **47**, 165—170 (1977).
68. *Mitchell W. M., Harrington W. F.*, J. Biol. Chem., **243**, 4683—4692 (1968).
69. *Moonen P., Akeroyd R., Westerman J., Puijk W. C., Smits P., Wirtz K. W. A.*, Eur. J. Biochem., **106**, 279—290 (1980).
70. *Morgan F. J., Birken S., Canfield R. E.*, J. Biol. Chem., **250**, 5247—5258 (1975).
71. *Muzbek L., Laki K.*, Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A., **71**, 2208—2211 (1974).
72. *Narayanan A., Anwar R. A.*, Biochem. J., **114**, 11—17 (1969).
73. *Nissonoff A., Wissler F. C., Lipman L. N., Woernley D. L.*, Arch. Biochem. Biophys., **89**, 230—244 (1960).
74. *Nyman P. O., Strid K., Westermark G.*, Biochem. Biophys. Acta, **122**, 554—556 (1966).
75. *Patty L., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., **250**, 557—564 (1975).
76. *Perlman G. E., Lorand L.* (Eds.), Methods Enzymol., **19** (1970).
77. *Pfleiderer G., Krauss A.*, Biochem. Z., **342**, 85—94 (1965).
78. *Plapp B. V., Raftery M. A., Cole R. D.*, J. Biol. Chem., **242**, 265—270 (1967).
79. *Porter R. R.*, Biochem. J., **73**, 119—126 (1959).

80. *Prober J. S., Guild B. C., Strominger J. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **75**, 6002—6006 (1978).
81. *Raftery M. A., Cole R. D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **6**, 467—472 (1963).
82. *Raftery M. A., Cole R. D.*, J. Biol. Chem., **241**, 3457—3461 (1966).
83. *Rydén A.-C., Rydén L., Philipson L.*, Eur. J. Biochem., **44**, 105—114 (1974).
84. *Scawen M. D., Ramshaw J. A. M., Brown R. H., Boulter D.*, Eur. J. Biochem., **44**, 299—303 (1974).
85. *Schechter I., Berger A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **32**, 898—902 (1968).
86. *Schenkein I., Boesman M., Tokarsky E., Fishman L., Levy M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **36**, 156—165 (1969).
87. *Schenkein I., Levy M., Fishman L.*, Methods Enzymol., **19**, 672—681 (1969).
88. *Schenkein I., Levy M., Franklin E. C., Frangione B.*, Arch. Biochem. Biophys., **182**, 64—70 (1977).
89. *Schenkein I., Gabor M., Franklin E. C., Frangione B.*, Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., **38**, 326 (1979).
90. *Schenkein I., Franklin E. C., Frangione B.*, Arch. Biochem. Biophys., **209**, 57—62 (1981).
91. *Schroeder W. A., Shelton J. R., Robberson B.*, Biochim. Biophys. Acta, **147**, 590—592 (1967).
92. *Schultz J.*, Mehtods Enzymol., **11**, 255—263 (1967).
93. *Shih J. W. K., Hash J. H.*, J. Biol. Chem., **246**, 994—1006 (1971).
94. *Shipolini R. A., Callewaert G. L., Cottrell R. C., Vernon C. A.*, Eur. J. Biochem., **48**, 465—476 (1974).
95. *Signor A., Bonora G. M., Biondi L., Nisato D., Marzotto A., Scoffone E.*, Biochemistry, **10**, 2748—2752 (1971).
96. *Sluyterman L. A. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **139**, 418—429 (1967).
97. *Sluyterman L. A. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **139**, 430—438 (1967).
98. *Smith E. L.*, Methods Enzymol., **47**, 156—161 (1977).
99. *Smyth D. G.*, Methods Enzymol., **11**, 214—231 (1967).
100. *Sodek J., Hodges R. S., Smillie L. B.*, J. Biol. Chem., **253**, 1129—1136 (1978).
101. *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **235**, 648—659 (1960).
102. *Stone D., Smillie L. B.*, J. Biol. Chem., **253**, 1137—1148 (1978).
103. *Stone D., Phillips A. W., Burchall J. J.*, Eur. J. Biochem., **72**, 613—624 (1977).
104. *Thomas K. A., Silverman R. E., Jeng I., Baglan N. C., Bradshaw R. A.*, Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., **38**, 324 (1979).
105. *Toi K., Bynum E., Norris E., Itano H. A.*, J. Biol. Chem., **242**, 1036—1043 (1967).
106. *Uehara H., Ewenstein B. M., Martinko J. M., Nathenson S. G., Kindt T. J., Coligan J. E.*, Biochemistry, **19**, 6182—6188 (1979).
107. *Walker J. M., Hastings J. R. B., Johns E. W.*, Eur. J. Biochem., **76**, 461—468 (1977).
108. *Wall C. M., Grand R. J. A., Perry S. V.*, Biochem. J., **195**, 307—316 (1981).
109. *Walter R., Yoshimoto T.*, Biochemistry, **17**, 4139—4144 (1978).
110. *Walton P. L., Turner R. W., Broadbent D.*, Br. Patent 1263956, (1972).
111. *Walton P. L., Jones C., Jackson S. J.*, In: Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Davidson J. F., Rowan R. M., Samama M. M., Desnoyers P. C. (Eds.), vol. 3, Raven Press, New York, 1978, pp. 373—378.
112. *Wang T.-T., Young N. M.*, Anal. Biochem., **91**, 696—699 (1978).
113. *Wasserman R. L., Capra J. D.*, Immunochemistry, **15**, 303—305 (1978).
114. *Whitaker D. R.*, Can. J. Biochem., **43**, 1935—1954 (1965).

115. *Whitaker D. R.*, Methods Enzymol., **19**, 599—613 (1970).
116. *Wilkinson J. M., Grand R. J. A.*, Eur. J. Biochem., **82**, 493—501, (1978).
117. *Wingard M., Matsueda G., Wolfe R. S.*, J. Bacteriol., **112**, 940—949 (1972).
118. *Winstanley M. A., Trayer I. P.*, Biochem. Soc. Trans., **7**, 703—704 (1979).
119. *Wootton J. C., Baron A. J., Fincham J. R. S.*, Biochem. J., **149**, 749—755 (1975).
120. *Yankeelov J. A.*, Methods Enzymol., **25**, 566—579 (1972).
121. *Yankeelov J. A., Acree D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **42**, 886—891 (1971).
122. *Yoshida N., Sasaki A., Rashid M. A., Otsuka H.*, FEBS Lett., **64**, 122—125 (1976).
123. *Yoshimoto T., Orlowski R. C., Walter R.*, Biochemistry, **16**, 2942—2948 (1977).
124. *Yoshimoto T., Fischl M., Orlowski R. C., Walter R.*, J. Biol. Chem., **253**, 3708—3716 (1978).
125. *Zwilling R., Pfleiderer G.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **348**, 519—524 (1967).

Глава 4

ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ

Р. ШРОЕНЛОЕР, Дж. К. БЕННЕТ (R. SCHROHENLOHER J. C. BENNETT, *University of Alabama in Birmingham, Schools of Medicine and Dentistry, Birmingham, Alabama, U.S.A.*)

4.1. Введение

Дисульфидные мостики — это основной тип ковалентной связи в белках, соединяющей между собой отдельные участки полипептидной цепи или различные цепи. Внутрицепочечные дисульфидные связи участвуют в поддержании конформационной стабильности свернутой полипептидной цепи, способствуя тем самым правильной ориентации аминокислотных остатков, образующих активные центры или участки связывания ферментов, антител и других биологически активных белков. Межцепочечные дисульфидные связи соединяют между собой отдельные субъединицы или цепи, закрепляют «правильную» укладку полипептидных цепей в доменах, удерживаемую в противном случае лишь благодаря нековалентным взаимодействиям, и тем самым принимают участие в поддержании четвертичной структуры.

В цикле работ по определению структуры инсулина Сенгер и др. [35—37] впервые наблюдали дисульфидный обмен при частичном гидролизе белка в конц. HCl на холоду. При более детальном исследовании на модельных системах, включающих бис-2,4-динитрофенил-L-цистин (бис-ДНФ-цистин) и цистилбисглицин или окисленный глутатион, установлено, что реакция дисульфидного обмена протекает как в концентрированных минеральных кислотах, так и в слабоосновной среде, правда, по различному механизму. В кислой среде обмен ингибируется тиолами, в основной среде тиолы служат катализаторами, а SH-реагенты ингибиторами [35]. В этой же работе найдены условия частичного гидролиза инсулина с сохранением положения дисульфидных мостиков, благодаря чему было определено их положение в молекуле гормона. В работе [41] на примере взаимодействия цистина с окисленным глутатионом изучена стабильность дисульфидных связей в различных условиях; при этом показано, что дисульфидный обмен минимален при pH 2—6,5. Кроме того, при протеолизе рибонуклеазы в условиях, способствующих дисульфидному обмену, получены цистинсодержащие пептиды, включающие лишь две из четырех

дисульфидных связей белка, и тем самым впервые установлено, что дисульфидные связи могут иметь различную реакционную способность в реакции обмена. Однако маловероятно, чтобы по этой причине могла бы осуществляться перегруппировка дисульфидных связей в нативных белках. Правда, известны случаи дисульфидного обмена с низкомолекулярными соединениями [38, 40].

Таким образом, конкретный план определения положения дисульфидных связей зависит от структурных особенностей белка и реакционной способности его дисульфидных мостиков. В любом случае важно исключить возможность дисульфидного обмена в ходе анализа и, следовательно, в первую очередь найти подходящий способ фрагментации нативного белка.

В настоящей главе обсуждаются общепринятые подходы и методики определения положения дисульфидных связей в белках.

4.2. Принципиальная схема анализа

Принципиальная схема определения связанных между собой остатков полуцистина остается неизменной с того времени, когда она была впервые разработана Райли при исследовании бычьего инсулина [36]. Эта методика включает следующие этапы:

1) частичный гидролиз белка в условиях, исключающих перегруппировку дисульфидных связей;

2) фракционирование полученной смеси с целью выделения цистинсодержащих пептидов также в условиях, исключающих дисульфидный обмен;

3) расщепление цистинсодержащих пептидов на цистеинилпептиды;

4) выделение отдельных цистеинилпептидов;

5) идентификация полученных пептидов.

В более подробном виде постадийный план анализа приведен на рис. 4.1.

Для однозначной идентификации положения дисульфидных связей важно, чтобы каждый из цистинсодержащих пептидов включал только один дисульфидный мостик. Предварительно необходимо установить число и положение в полипептидной цепи остатков цистеина; поэтому к анализу приступают лишь после определения полной аминокислотной последовательности полипептидной цепи или цепей исследуемого белка. Число дисульфидных связей можно определить с помощью различных методов. Для этого наряду с установлением первичной структуры проводят исследование физико-химических свойств белка. Данные относительно внутри- и межцепочечных дисульфидных

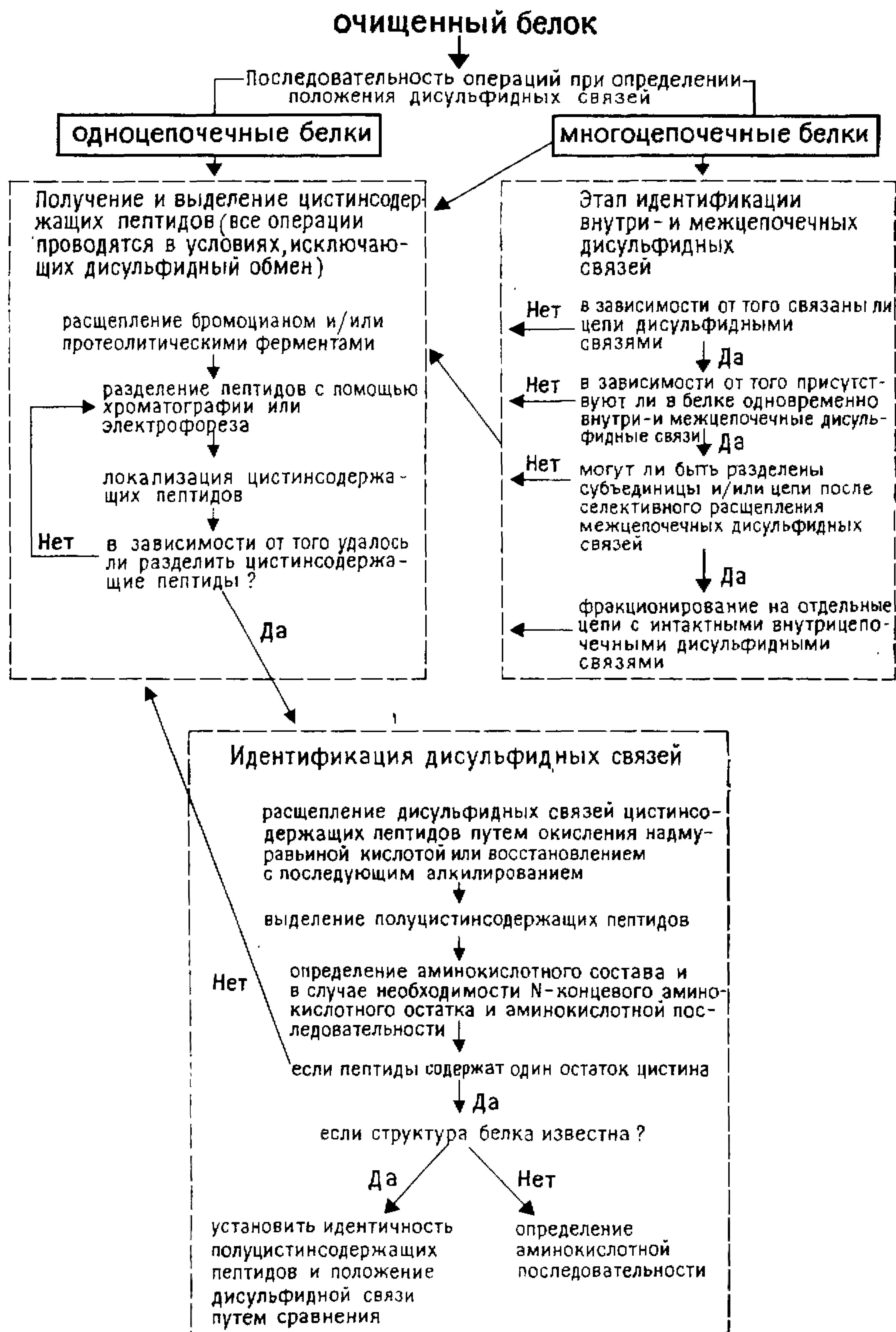


РИС. 4.1. Общая схема определения положения дисульфидных связей в очищенных белках и пептидах.

связей могут быть получены с помощью физико-химических методов. Продемонстрируем сказанное на следующем примере [13, 19].

После восстановления в мягких условиях дитиотреитом молекула человеческого иммуноглобулина IgG присоединяет 8 молей [^{14}C] иодоацетамида, в то время как нативный белок присоединяет всего 0,5 моля этого реагента. Поскольку восстановление проводят в условиях, обеспечивающих полную диссоциацию полипептидных цепей, это означает, что молекула иммуноглобулина имеет не более четырех межцепочечных дисульфидных мостиков. Следовательно, остальные 26 остатков полуцистина, найденные по данным аминокислотного анализа, образуют внутрицепочечные связи. Более того, распределение меченых остатков в отдельных цепях свидетельствует о том, что каждая легкая цепь связана с тяжелой одной дисульфидной связью, а две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными мостиками.

При анализе белков со сложной четвертичной структурой целесообразно разделять их на составляющие субъединицы или полипептиды. В случае иммуноглобулинов для диссоциации полипептидных цепей проводили избирательное восстановление межцепочечных дисульфидных связей [44, 46]. Для получения крупных, хорошо идентифицируемых фрагментов, пригодных для дальнейшего расщепления до коротких цистинсодержащих пептидов, нативные белки расщепляют бромоцианом или протеолитическими ферментами [19, 28, 42, 46, 47].

Для оценки соответствия цистинсодержащих пептидов структуре нативного белка существенное значение имеет выход пептидов. Действительно, выделение пептида с высоким выходом служит наиболее убедительным доказательством того, что два остатка полуцистина связаны между собой в нативном белке. Считается вполне удовлетворительным, если выход составляет 50%, однако выход может быть занижен из-за механических потерь и неколичественного протекания реакции расщепления. Низкий выход пептидов не исключает иного распределения дисульфидных связей, и, следовательно, полученные данные могут быть признаны убедительными лишь при отсутствии противоречивых сведений, например если не будет найден цистинсодержащий пептид, включающий один из идентифицированных остатков полуцистина.

4.3. Определение числа дисульфидных связей

Число дисульфидных связей определяют по содержанию в белке остатков карбоксиметилцистеина, т. е. по аминокислотному составу белка до и после его полного восстановления и карбо-

ксиметилирования. В случае многоцепочечных белков для получения дополнительной информации о распределении дисульфидных связей их фракционируют на составляющие полипептидные цепи. Остатки полуцистина определяют по содержанию метки после восстановления и последующего алкилирования радиоактивно меченными SH-реагентами. Удовлетворительные результаты получают при применении [^{14}C]иодоацетамида (1,2 мкКи/мкмоль) и [^{14}C]иодоуксусной кислоты (0,5 мкКи/мкмоль) [19, 31].

Содержание дисульфидных групп в белке можно определить спектрофотометрически или флуориметрически. Наиболее распространена методика, основанная на спектрофотометрическом определении дисульфидных групп с помощью реактива Эллмана [14]. В работе [29] с помощью этой методики определяли число внутри- и межцепочечных связей в человеческом иммуноглобулине IgM. Восстановленный (или нативный) белок осаждали на холоду 5%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ), осадок отделяли центрифугированием и пятикратно промывали раствором ТХУ для удаления восстановителя. Затем осадок растворяли в небольшом объеме 5 М гуанидина, раствор осветляли центрифугированием, концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм. К аликвотной части раствора белка добавляли равный объем 0,1 м трис-HCl (pH 9,1), содержащего 5 М гуанидин, 2×10^{-4} М 5,5′-дитиобис(2-нитробензойную) кислоту (ДТНБ); pH реакционной смеси 8,1. Содержание сульфгидрильных групп рассчитывали по поглощению при 412 нм и коэффициенту молярной экстинкции 2-нитро-5-бензоата ($\varepsilon = 13\,600$). Дисульфидные группы определяют также по тушению флуоресценции флуоресцеинмеркуриацетата [26].

4.4. Расщепление полипептидной цепи до коротких цистинсодержащих пептидов

Как уже отмечалось ранее, фрагментацию белков следует проводить в условиях, исключающих дисульфидный обмен: предпочтительно в диапазоне pH 2—6,5. Тем не менее для достижения удовлетворительных результатов часто приходится вести реакцию в области более основных pH. Например, с успехом применяют гидролиз трипсином и термолизином при pH 7,0—7,5 [19, 30, 41, 42]. Однако ввиду различной стабильности дисульфидных связей в белках при объяснении полученных результатов в этом случае не следует делать поспешных выводов.

Для первоначальной обработки белка часто применяют пепсин из-за его высокой активности в кислой среде и способности гидролизовать нативные белки. После того как стабильная структура нативного белка разрушена пепсином, можно прово-

дить дальнейший гидролиз другими ферментами в области pH, оптимальной для сохранения дисульфидных связей. При определении положения дисульфидных связей широко применяется расщепление бромоцианом в слабокислой среде по остаткам метионина. Метод обладает тем преимуществом, что при этом образуются вполне определенные фрагменты, которые могут быть выделены и использованы для последующей фрагментации.

Выбор ферментов для последующего расщепления определяется различными факторами и преследует цель получить небольшие пептиды, содержащие одну дисульфидную связь. Наиболее часто применяют обработку трипсином, химотрипсином, стафилококковой протеазой или термолизином в отдельности или в различных сочетаниях. Иногда с успехом используют ферменты с более узкой специфичностью, например плазмин, эластазу [5, 11]. Для анализа пептидов, содержащих две дисульфидные связи, разделенные несколькими остатками аминокислот применяют деградацию по Эдману [20].

Особенности методов расщепления при определении дисульфидных связей рассмотрены в настоящей главе, относительно гидролиза протеазами см. гл. 3 и 10, относительно химических методов расщепления см. гл. 1 и 2.

4.4.1. Расщепление бромоцианом

Этот метод расщепления белков подробно рассматривается в разд. 2.4.1.1. [21].

4.4.2. Гидролиз пепсином

Согласно методике Спакмена и сотр. [41], впервые использованной при изучении рибонуклеазы A, 0,1%-ный раствор белка в 0,05 *M* Na-цитратном буфере (pH 1,0) инкубируют с пепсином при соотношении фермент : субстрат = 1 : 50 при 25 °C в течение 16 ч. Последующие модификации методики включают увеличение концентрации фермента, проведение инкубации при 37 °C, уменьшение времени гидролиза, применение других растворителей, например 5%-ной муравьиной кислоты и 0,03 M HCl [30, 34, 42, 43]. Гидролиз останавливают замораживанием, в случае необходимости раствор лиофилизируют. Полезную информацию можно найти в разд. 3.6.3.

4.4.3. Гидролиз трипсином и химотрипсином

После инкубации белка с пепсином по методике, описанной в разд. 4.4.2, реакционную смесь подщелачивают до pH 6,5 и инкубируют с трипсином (при соотношении фермент : субст-

рат=1 : 25) при 25 °С в течение 8 ч [41], а затем с химотрипсином при соотношении фермент : субстрат=1 : 100. Реакцию прерывают путем подкисления конц. HCl до pH 2. Степень гидролиза пептидных связей определяют по увеличению содержания свободных аминогрупп, используя реакцию с нингидрином или *о*-фталевым диальдегидом. Хорошие результаты получены при проведении гидролиза при 40 °С [30]. Дополнительные сведения о проведении ферментативного гидролиза приводятся в разд. 3.6.1.

Иногда гидролиз трипсином проводят при нейтральном или слабощелочном значении pH, однако при этом необходимо доказать, что не происходит дисульфидного обмена. Фрагменты человеческого иммуноглобулина IgG (полученные при расщеплении белка бромоцианом) инкубировали с трипсином (2%) при pH 7,2 в течение 4 ч [19]. При гидролизе в присутствии избытка [C^{14}]иодоацетамида показано, что белок не содержит нестабильных дисульфидных связей. В аналогичных условиях проводили триптический гидролиз фрагмента иммуноглобулина IgG (полученного при гидролизе белка пепсином), однако в отсутствие контроля за дисульфидным обменом [42]. Положение двух из четырех дисульфидных связей кардиотоксина яда кобры определено по строению цистинсодержащих пептидов, полученных при гидролизе белка трипсином при pH 7 в течение 24 ч [30]. Дополнительные сведения приводятся в разд. 3.5.1.

4.4.4. Гидролиз стафилококковой протеазой

Протеаза из культуральной жидкости *Staphylococcus aureus* V8 [12] при pH 4 в аммонийноацетатном буфере специфически расщепляет пептидные связи по карбоксильной группе остатка глутаминовой кислоты [24].

При последовательном расщеплении человеческого β-тромбоглобулина бромоцианом в 70%-ной муравьиной кислоте и стафилококковой протеазой при pH 4,0 получены цистинсодержащие пептиды, по структуре которых определено положение двух дисульфидных связей [3]. Белок, обработанный бромоцианом (20 мг/мл), инкубировали с ферментом (при соотношении фермент : субстрат=1 : 40) в 0,05 М аммонийноацетатном буфере при pH 4,0 при 37 °С в течение 18 ч. См. также разд. 3.5.3.

4.4.5. Гидролиз термолизином

При определении положения дисульфидных связей в α-лактальбумине [45] и 2,5 S мышином ростовом факторе нервной ткани [2] цистинсодержащие пептиды получали гидролизом пептических фрагментов термолизином. В случае α-лактальбумина гид-

ролиз проводили при 37 °С в 0,0025 м $CaCl_2$ при pH 7,5. pH устанавливали постепенным добавлением 1 *М* триса, реакцию останавливали путем подкисления реакционной смеси до pH 3,1 с помощью HCl. Пептиды ростового фактора растворяли в воде и инкубировали с термолизином в течение 22 ч, поддерживая pH 7,0 с помощью автотитратора. Высокий выход цистинсодержащих пептидов свидетельствовал об отсутствии дисульфидного обмена [45]. Гидролиз термолизином проводят также при pH 6,5 и 6,9 [5, 30]. См. также разд. 3.6.2.

4.4.6. Гидролиз после малеилирования и сукцинилирования

Встречаются случаи, когда белок сохраняет устойчивость к действию протеаз после денатурации с 8 *М* мочевиной, 6 *М* гуанидин-HCl, кипячения или выдерживания в кислой среде. Подход к анализу таких белков разработан в работе [5]. Хотя токсин B-IV (нейротоксин, селективный к ракообразным) оказался чрезвычайно устойчивым к протеолизу как в нативном, так и в денатурированном состоянии, его производные (малеил- и сукцинил-) были чувствительны к действию трипсина.

4.4.6.1. Сукцинилирование [9]. К 1%-ному раствору белка в 1,0 *М* Na-бикарбонатном буфере (pH 8,0) при 25 °С постепенно в течение 1 ч добавляют 0,8 части (по массе) янтарного ангидрида. pH 8,0 реакционной смеси поддерживают путем добавления 0,1 *М* NaOH. Через 1—2 ч реакционную смесь разбавляют 2,5 объема дистиллированной воды и диализуют в течение 12 ч. Модификацию некоторых белков вполне возможно проводить в более мягких условиях [22]. Затем модифицированный белок может быть инкубирован одновременно в присутствии трипсина, химотрипсина и термолизина при соотношении фермент : субстрат = 1 : 50. Условия инкубации: 0,1 *М* К-фосфатный буфер (pH 6,8), 40 °С. Спустя 4 ч раствор подкисляют до pH 3,0 и высушивают лиофильно.

4.4.6.2. Малеилирование [5]. С помощью частичного малеилирования устойчивому к протеолизу белку можно придать чувствительность к действию трипсина. Реакцию проводят при 10-кратном избытке малеинового ангидрида (на каждую аминогруппу) при pH 8,0 в течение 5 ч. Затем доводят pH смеси до 7,0 и инкубируют модифицированный белок с трипсином при 37 °С и при соотношении фермент : субстрат = 1 : 33. Реакцию останавливают путем подкисления до pH 3,0. Снятие защитных групп проводят при pH 3,5, 37 °С в течение 48 ч [7]. Смесь пептидов может быть подвергнута дальнейшему гидролизу трипсином или другими протеазами.

Следует отметить, что при модификации и гидролизе белок выдерживают в нейтральной или слабоосновной среде, т. е. в условиях, в принципе не исключающих дисульфидный обмен.

Относительно малеилирования см. разд. 3.4.2.2.

4.5. Фракционирование цистинсодержащих пептидов

Выделение и очистка цистинсодержащих пептидов представляет самостоятельную задачу. Основные проблемы связаны здесь с нестабильностью дисульфидных связей и необходимостью анализа полученных пептидов колориметрическими методами. В слабокислой среде (pH 2,0—6,5) дисульфидные связи относительно устойчивы. Это обстоятельство ограничивает выбор методов расщепления полипептидной цепи и методов выделения полученных пептидов. Поэтому на предварительном этапе надо определить структуру полуцистинсодержащих фрагментов. Зная первичную структуру, гораздо легче составить схему расщепления нативного белка, позволяющую сконцентрировать внимание лишь на пептидах, содержащих дисульфидные связи.

4.5.1. Методы фракционирования

Ввиду устойчивости цистинсодержащих пептидов в слабокислой среде (pH 2,0—6,5) для фракционирования используют гель-фильтрацию [8] и ионообменную хроматографию [2, 41]. Гель-фильтрацию проводят на сефадексе в 25%-ной уксусной кислоте [17], ионообменную хроматографию — на катионитах [45]. При фракционировании необходимо прежде всего разделить цистинсодержащие пептиды, отделение их от других пептидов вовсе не обязательно [36, 41]. Прочие пептиды легко отделить на последующей стадии, после окисления цистина в цистеиновую кислоту. Например, пептиды с цистеиновой кислотой можно эффективно фракционировать с помощью высокоэффективной или ион-парной хроматографии [23]. В присутствии фосфорной кислоты достигается почти идеальное разрешение при хроматографии на эффективных колонках в органических растворителях (гл. 6).

4.5.2. Обнаружение цистинсодержащих пептидов

При разделении и очистке цистинсодержащих пептидов необходимо располагать избирательным методом обнаружения. Широкое применение находит определение аминокислотного состава фракций после окисления пептидов надмуравьиной кислотой [41]. По наличию в пептиде остатка цистеиновой кислоты выявляют фракции, содержащие цистин. Показано, что сера

в частично окисленном состоянии обесцвечивает раствор иодоплатината [16]. Эта реакция может использоваться как быстрый и чувствительный тест на дисульфиды, хотя аналогичную реакцию дает сера в виде тиолов и тиоэфиров. Чувствительный флуориметрический метод обнаружения основан на тушении флуоресценции при взаимодействии дисульфидов с флуоресценнмеркуриацетатом в основной среде [26]. К сожалению, методика плохо воспроизводится.

4.5.2.1. Дисульфидный анализ [1]. Методика хорошо воспроизводится и может быть автоматизирована. Раствор пептида (в том числе фракции после хроматографии) смешивают с равным объемом 6 М NaOH и инкубируют в течение ~30 мин. Реакцию останавливают путем добавления при энергичном перемешивании 0,5 мл 2 М фосфорной кислоты, содержащей 2×10^{-3} М ЭДТА. К полученному раствору (pH 6,0—7,0) добавляют 0,1 мл раствора ДТНБ (1,0 мг/мл в 0,02 М ацетате натрия, pH 5,5) и определяют поглощение при 412 нм. ЭДТА связывает ионы металлов, катализирующие окисление тиолов и тем самым стабилизирует окраску. Тем не менее спустя 60 мин поглощение падает на 1—2%. При построении градуировочного графика используют глутатион (0—$2,5\times10^{-4}$ моль/л).

4.6. Идентификация и локализация цистинсодержащих пептидов

Для точной идентификации пептидов, связанных дисульфидными мостиками, необходимо расщепить дисульфидные связи и выделить образующиеся фрагменты.

4.6.1. Расщепление дисульфидных связей

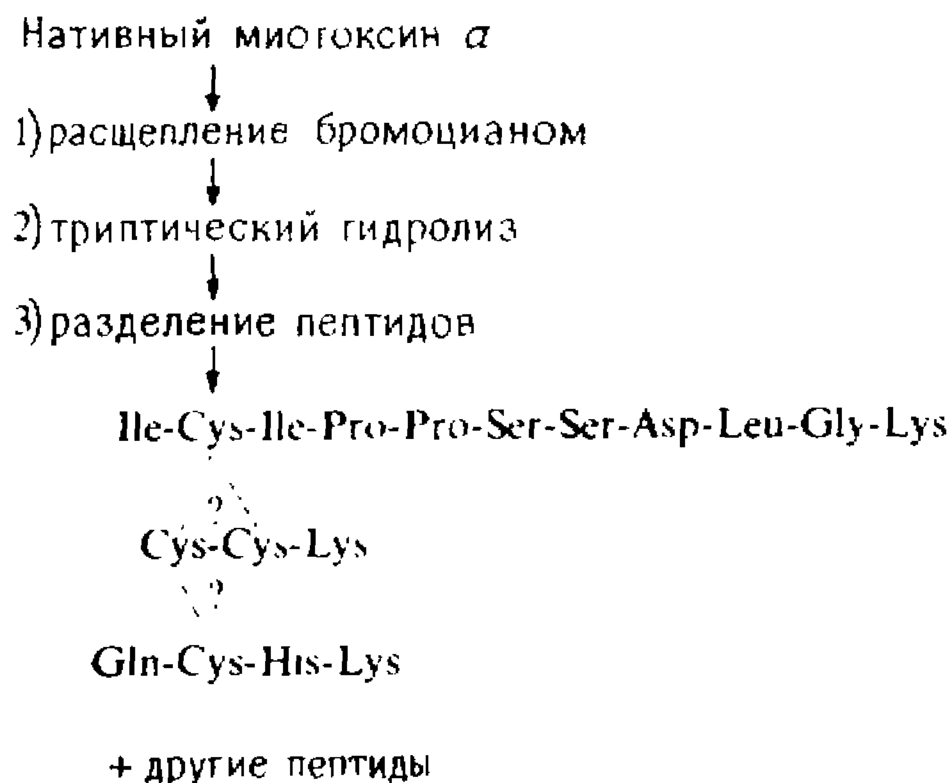
Методы расщепления дисульфидных связей рассматриваются в разд. 1.5.1 и 2.2. Общеприняты методы окисления надмуравьиной кислотой [41] и восстановления с последующим алкилированием [48]. Образующиеся полуцистинпептиды выделяют с помощью обычных методов химии белка, включающих гель-фильтрацию, хроматографию, электрофорез на бумаге, высокоэффективную хроматографию и др.

4.6.2. Идентификация по известной аминокислотной последовательности

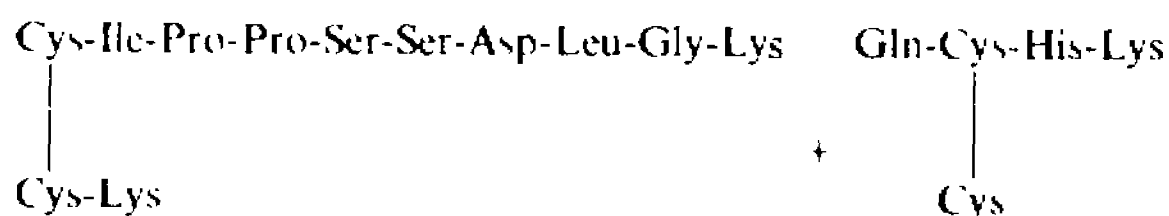
Анализ известной аминокислотной последовательности позволяет наметить оптимальный подход к определению положения дисульфидных связей. Для однозначной идентификации каждый цистинсодержащий пептид должен включать лишь одну дисульфидную связь. Следовательно, линейная последовательность интактной полипептидной цепи между ближайшими остатками полуцистина должна быть расщеплена хотя бы в одной точке. Иногда хорошие результаты дает расщепление бромоцианом.

Однако в случае крупных белков, имеющих несколько дисульфидных мостиков, более эффективен гидролиз с помощью относительно низкоспецифичных протеаз, например термолизина [45].

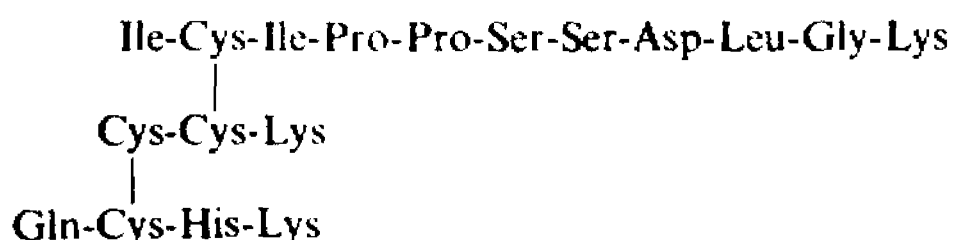
Из множества возможных схем приведем простую и изящную схему анализа определения положения дисульфидных связей в миотоксине *a* [18].



После расщепления бромоцианом и триптического гидролиза были выделены три коротких пептида, связанные дисульфидными мостиками (вероятное положение дисульфидных связей указано штриховыми линиями). Поскольку при анализе руководствовались известной структурой, пептиды были подвергнуты одностадийной деградации по Эдману в секвенсере, обессолены и фракционированы. При этом были получены два фрагмента:



Из приведенных структур следует, что при секвенировании был удален остаток Ile, один остаток Cys, а остаток Gln циклизовался в пирролидонкарбоновую кислоту. Отсюда следует следующее расположение дисульфидных связей в миотоксине *a*:



Вполне очевидно, что каждый белок требует своей специфической схемы анализа.

4.6.3. Идентификация дисульфидных связей у белков с неизвестной аминокислотной последовательностью

При анализе белка с неизвестной структурой работать приходится «вслепую». Обычно для получения цистинсодержащих пептидов, имеющих лишь одну дисульфидную связь, с успехом используют термолизин [45]. Таким путем удается выделить и секвенировать пептиды независимо от порядка расположения остатков полуцистина в полипептидной цепи. Для сравнительного анализа, например структурно гомологичных белков, этот метод вполне приемлем. Он дает достаточно полную информацию еще до завершения определения полной первичной структуры.

4.6.4. Общие замечания

Предположим, что аминокислотная последовательность и положение большинства дисульфидных связей в белке установлены; в этом случае, очевидно, место последнего дисульфидного мостика можно принять без доказательств. Например, положение трех из четырех мостиков определено однозначно, следовательно, уместно предположить, что последний мостик связывает два неидентифицированных остатка полуцистина. Как уже отмечалось, выделение цистинсодержащих пептидов может сопровождаться значительными потерями, в некоторых случаях выход составляет <50%. Однако при отсутствии противоречивых фактов даже этого бывает вполне достаточно для однозначной локализации S—S-мостиков. Естественно, вывод будет справедлив при условии стабильности дисульфидных связей в пределах белковой молекулы. Редким исключением, с которым обычно не приходится встречаться, является β-лактоглобулин [27], дисульфидные связи которого нестабильны.

4.7. Специальные методы

4.7.1. Красители

Для обнаружения цистеина и цистина на хроматограммах используются специальные реагенты [39], сведения о которых можно найти в разд. 8.14.3.

4.7.2. Диагональное картирование

Метод диагональных карт был разработан специально для анализа цистинсодержащих пептидов [4, 6]. Известны различные модификации этого метода, однако наиболее часто используют

его исходный вариант — электрофорез на бумаге. Ферментативный гидролизат исследуемого белка разделяют электрофоретически на бумаге ватман 3ММ (400×400 мм). Затем электрофореграмму высушивают и выдерживают в парах надмуравьиной кислоты в течение 2 ч для окисления S—S-связей. После высушивания в вакуум-эксикаторе над NaOH проводят электрофорез в аналогичных условиях, но в направлении, перпендикулярном первоначальному. В результате все немодифицированные при окислении пептиды располагаются на электрофореграмме по диагонали, под углом 45°. Цистинсодержащие пептиды, которые подвергались промежуточному окислению, образуют пары фрагментов, располагающиеся вне диагонали. Эти зоны элюируют и полученные пептиды анализируют стандартными методами. Для выделения цистинсодержащих пептидов после первого электрофореза можно вырезать контрольную полоску, обработать парами надмуравьиной кислоты, подшить ее к другому листу бумаги и провести электрофорез вторично. Сравнивая полученную электрофореграмму с исходной, можно локализовать зоны, соответствующие цистинсодержащим пептидам, вырезать их и элюировать интактный материал для последующих операций. Известные модификации этого метода включают получение различных производных цистеина, например S-аминоэтилцистеина [33].

4.7.3. Специфическое расщепление по остаткам цистеина

К высокоспецифическим методам относятся расщепление по остаткам цистеина с помощью 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислоты (НТБК) [25]. Эффективность этого метода была продемонстрирована на примере антигенов гистосовместимости, когда с помощью этой методики сравнивались последовательно расположенные дисульфидные петли [15]. Размеры дисульфидных циклов определяли по длине полученных фрагментов. Метод может найти применение при выявлении структурной гомологии родственных белков. К сожалению, образующиеся фрагменты имеют на N-конце тиазолидиновые циклы и не могут быть секвенированы непосредственно. Имеются данные, что деблокирование можно проводить на никеле Ренея [32] (гл. 2). При этом остатки цистина превращаются в аланин, остатки метионина — в β-аминомасляную кислоту, становится возможным секвенирование.

4.7.3.1. Расщепление 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислотой [10, 15]. Образец лиофилизованного белка (несколько нмоль) растворяют в 0,2 М трис-ацетатном буфере (рН 8,0), содержащем

6 М гуанидин-HCl+2 мМ дитиотреит+1 мМ ЭТДА, и инкубируют при 37 °С в течение 2 ч. Затем образец разбавляют 0,7 мл исходного буфера и добавляют 0,5 мл 30 мМ НТБК. Инкубируют реакционную смесь при 20 °С в течение 30 мин, доводят pH до 9,5 с помощью 1 М NaOH и вновь инкубируют при 55 °С в течение 24 ч. Реакцию останавливают путем подкисления до pH 4 ледяной уксусной кислотой.

Литература

1. *Anderson W. L., Wetlaufer D. B.*, Anal. Biochem., **67**, 493—502 (1975).
2. *Angeletti R. H., Hermodson M. A., Bradshaw R. A.*, Biochemistry, **12**, 100—115 (1973).
3. *Begg G. S., Pepper D. S., Chesterman C. N., Morgan F. J.*, Biochemistry, **17**, 1739—1744 (1978).
4. *Bennett J. C.*, Methods Enzymol., **11**, 330—339 (1967).
5. *Blumenthal K. M., Kem W. R.*, J. Biol. Chem., **252**, 3328—3331 (1977).
6. *Brown J. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **101**, 214—228 (1966).
7. *Butler P. J. G., Harris J. I., Hartley B. S., Leberman R.*, Biochem. J, **112**, 679—689 (1969).
8. *Canfield R. E., Liu A. F.*, J. Biol. Chem., **240**, 1997—2002 (1965).
9. *Chu F. S., Crary E., Bergdoll M. S.*, Biochemistry, **8**, 2890—2896 (1969).
10. *Degani Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **13**, 1—11 (1974).
11. *Doolittle R. F., Cottrell B. A., Strong D., Watt K. W. K.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **84**, 495—500 (1978).
12. *Drapeau G. R., Boily Y., Houmard J.*, J. Biol. Chem., **247**, 6720—6729 (1972).
13. *Edelman G. M., Gall W. E., Waxdal M. J., Konigsberg W. A.*, Biochemistry, **7**, 1950—1958 (1968).
14. *Ellman G. L.*, Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70—77 (1959).
15. *Ferguson W. S., Terhorst C. T., Robb R. L., Strominger J. L.*, Mol. Immunol., **16**, 23—28 (1979).
16. *Fowler B., Robins A. J.*, J. Chromatogr., **72**, 105—111 (1972).
17. *Fox J. W., Elzinga M., Tu A. T.*, Fed. Eur. Biol. Scientists Lett., **80**, 217—220 (1977).
18. *Fox J. W., Elzinga M., Tu A. T.*, Biochemistry, **18**, 678—684 (1979).
19. *Gall W. E., Cunningham B. A., Waxdal M. J., Konigsberg W. H., Edelman G. M.*, Biochemistry, **7**, 1973—1982 (1968).
20. *Gauldie J., Hanson J. M., Shipolini R. A., Vernon C. A.*, Eur. J. Biochem., **83**, 405—410 (1978).
21. *Gross E., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1510—1511 (1961).
22. *Habeeb A. F. S. A., Cassidy H. G., Singer S. J.*, Biochim. Biophys. Acta, **29**, 587—593 (1958).
23. *Hearn M. T. W., Hancock W. S.*, Trends Biochem. Sci., Pers. Edn. N58—N62 (1979).
24. *Hourmard J., Drapeau G. R.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 3506—3509 (1972).
25. *Jacobson G. R., Schaffer M. H., Stark G. R., Vanaman T. C.*, J. Biol. Chem., **248**, 6583—6591 (1973).
26. *Karush J., Klinman N. R., Marks R.*, Anal, Biochem., **9**, 100—114 (1964).
27. *McKenzie H. A., Ralston G. B., Shaw D. C.*, Biochemistry, **11**, 4539—4547 (1972).
28. *Mestecky J., Schrohenloher R. E., Kulhavy R., Wright G. P., Tomana M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **71**, 544—548 (1974).
29. *Miller F., Metzger H.*, J. Biol. Chem., **240**, 4740—4745 (1965).

30. *Narita K., Cheng K.-L., Chang W.-C., Lo T.-B.*, Int. J. Peptide Protein Res., **11**, 229—237 (1978).
31. *Oliveira B., Lamm M. E.*, Biochemistry, **10**, 26—31 (1971).
32. *Otieno S.*, Biochemistry, **17**, 5468—5473 (1978).
33. *Perham R. N.*, Biochem. J., **105**, 1203—1207 (1967).
34. *Préval C. de., Fougereau M.*, Eur. J. Biochem., **30**, 452—462 (1972).
35. *Ryle A. P., Sanger F.*, Biochem. J., **60**, 535—540 (1955).
36. *Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F., Kitai R.*, Biochem. J., **60**, 541—556 (1955).
37. *Sanger F.*, Nature (Lond.), **171**, 1025—1026 (1953).
38. *Schrohenloher R. E.*, Immunochemistry, **8**, 375—389 (1971).
39. *Scoffone E., Fontana A.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), 2nd edn., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975, p. 202.
40. *Smithies O.*, Science, **150**, 1595—1598 (1965).
41. *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **235**, 648—659 (1960).
42. *Steiner L. A., Porter R. R.*, Biochemistry, **6**, 3957—3970 (1967).
43. *Strausbauch P. H., Hurwitz E., Gival D.*, Biochemistry, **10**, 2231—2237 (1971).
44. *Strosberg A. D., Margolies M. N., Haber E.*, J. Immunol., **115**, 1422—1424 (1975).
45. *Vanaman T. C., Brew K., Hill R. L.*, J. Biol Chem., **245**, 4583—4590 (1970).
46. *Waxdal M. J., Konigsberg W. A., Henley W. L., Edelman G. M.*, Biochemistry, **7**, 1959—1966 (1968).
47. *Waxdal M. J., Konigsberg W. A., Edelman G. M.*, Biochemistry, **7**, 1967—1972 (1968).
48. *Zahler W. L., Cleland W. W.*, J. Biol. Chem., **243**, 716—719 (1968).

Глава 5

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ

А. Д. ШТРОСБЕРГ (A. D. STROSBERG, *Molecular Immunology Laboratory, IRBM — CNRS and University of Paris VII, Place Jussieu 2, Paris 75251, France*)

5.1. Введение

Аффинная хроматография — один из главных методов очистки белков — основана на взаимодействии между двумя биологически активными веществами, одно из которых обычно ковалентно присоединено к инертному носителю. Аффинная хроматография используется для очистки белков — антител, ферментов, гормонов, рецепторов — и других биополимеров — полисахаридов и нуклеиновых кислот, а также биологических макрочастиц, например вирусов и клеток.

В этой главе рассматриваются вопросы и проблемы практического характера, которые возникают на разных этапах эксперимента. В схематическом виде различные этапы аффинной хроматографии представлены на рис. 5.1.

Более подробное изложение теоретических основ аффинной хроматографии читатель может найти в литературе, указанной в конце главы.

5.2. Область применения аффинной хроматографии

На каком этапе общей схемы очистки следует использовать аффинную хроматографию? Различные возможности применения аффинной хроматографии в схематическом виде представлены на рис. 5.2.

Аффинная хроматография может быть использована на начальном этапе очистки при условии, что выделяемый белок настолько прочно и специфически взаимодействует с лигандом, что отделение его от сопутствующих примесей достигается в одну стадию. К таким примерам относится извлечение из сыворотки крови специфических антител с помощью иммобилизованных антигенов, извлечение гормонов из солюбилизированных плазматических мембран. Аффинная хроматография особенно эффективна в качестве начального этапа в том случае, если стабильность выделяемого вещества вызывает сомнение и необходимо по возможности сократить число стадий очистки. Причиной нестабильности может быть термолабильность белко-

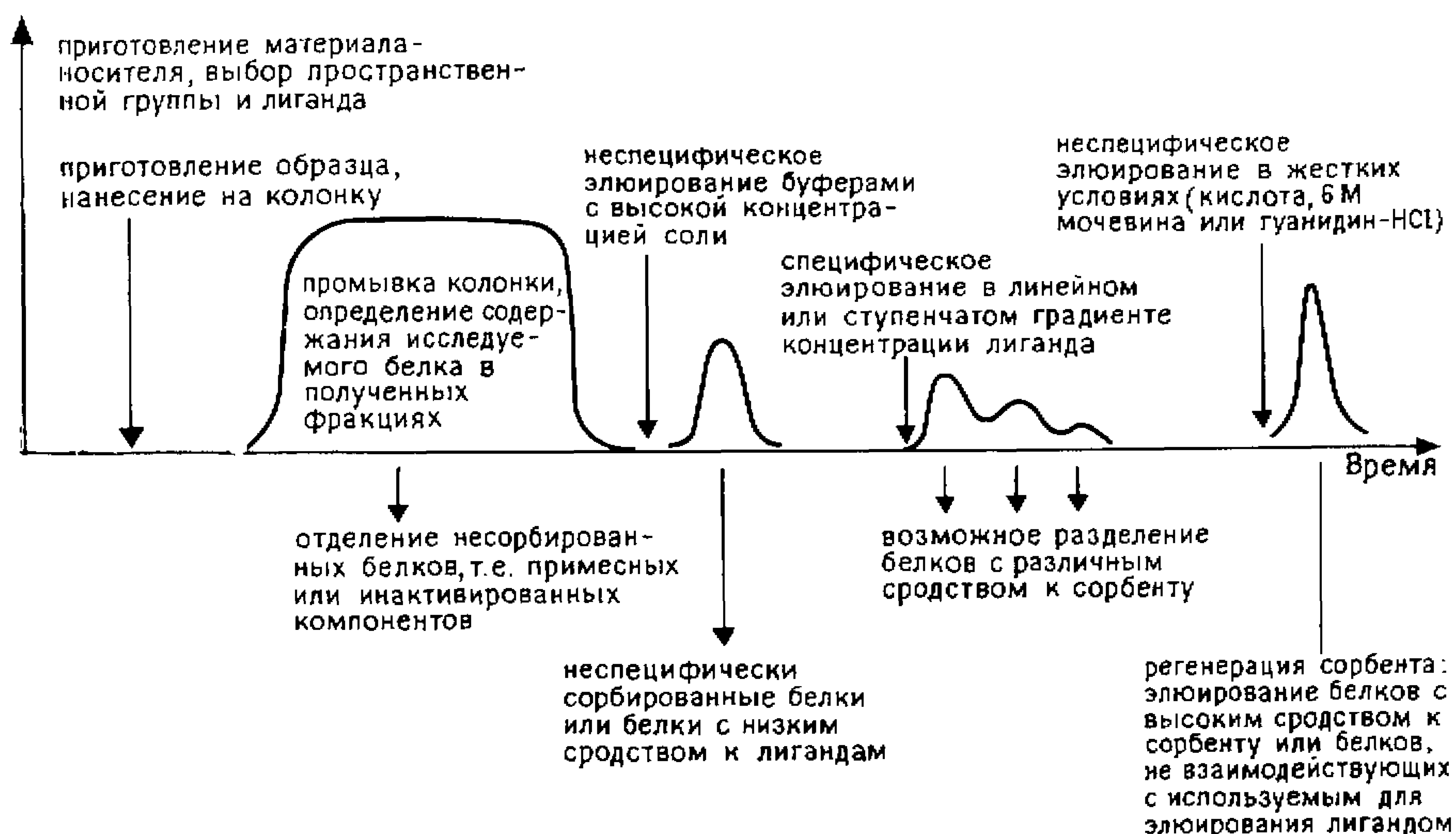


РИС. 5.1. Основные этапы аффинной хроматографии.

вой молекулы, чувствительность к действию протеаз, присутствующих в исходном экстракте, или необходимость сохранения специфического микроокружения — фосфолипидов или других веществ, ассоциированных с белком.

Часто аффинную хроматографию с успехом применяют на завершающем этапе выделения после частичной очистки с помощью менее специфических рутинных методов, например осаждения сульфатом аммония, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Специфическое элюирование целевого продукта в этом случае может служить критерием его чистоты, а также тестом на сохранение биологической активности.

Аффинная хроматография может также использоваться в качестве промежуточной стадии выделения, однако при этом не ставится задача обеспечить полноту очистки.

5.3. Методы приготовления аффинного сорбента

5.3.1. Понятие об аффинном сорбенте

Подбор сорбента с соответствующими характеристиками является в аффинной хроматографии вопросом первостепенной важности. Аффинный сорбент состоит из трех частей: носителя, пространственной группы и лиганда. Присутствие всех трех элементов иногда необязательно; например, для аффинной хроматографии лектинов носитель (сефадекс G-75, содержащий остат-

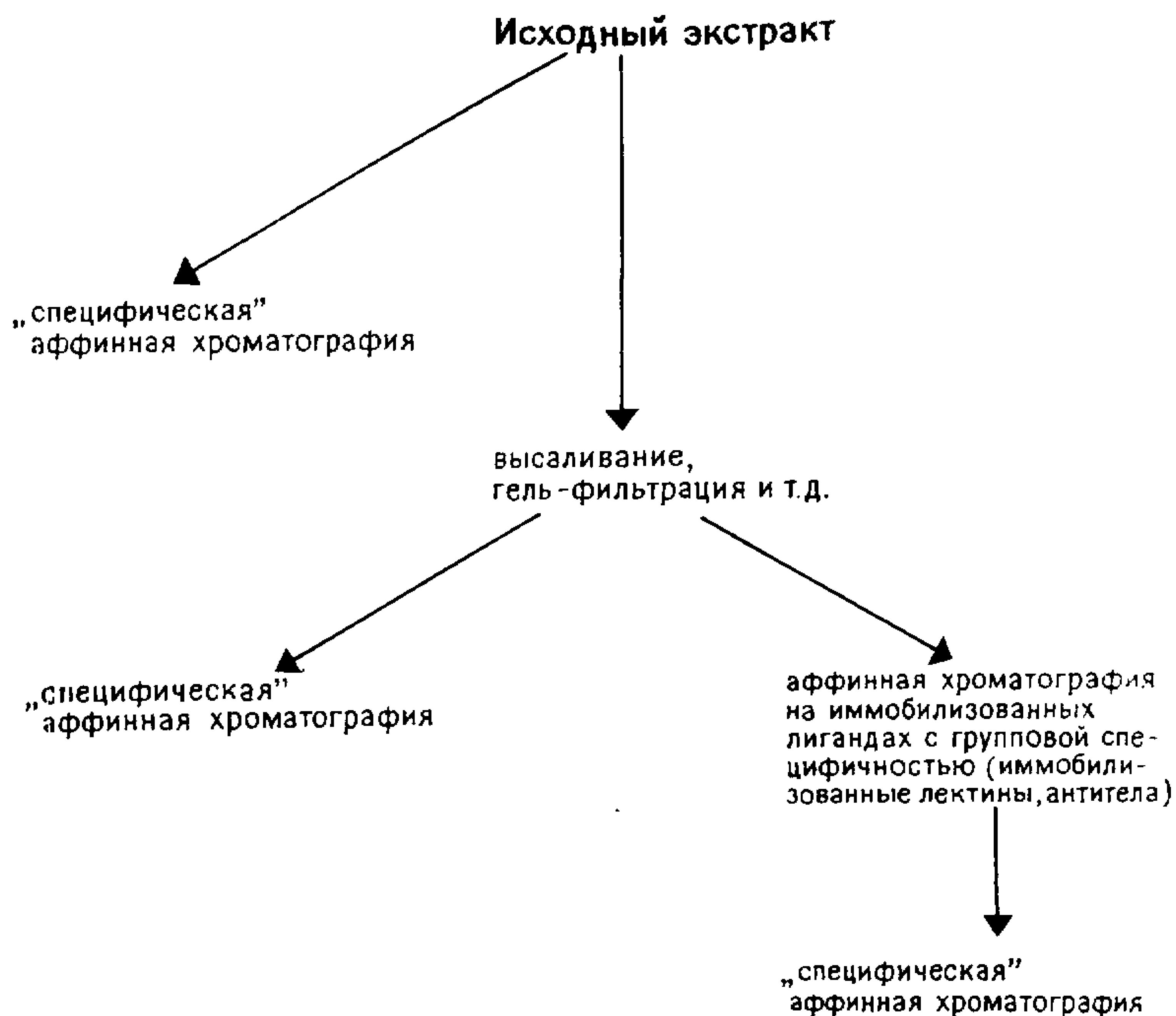


РИС. 5.2. Различные варианты использования аффинной хроматографии в принципиальной схеме очистки белков.

ки глюкозы и маннозы) сам по себе служит хорошим лигандом, узнаваемым лектином. В качестве другого примера можно привести очистку антидекстрановых антител на сефадексе G-100. Однако, как правило, лиганд фиксируют на носителе через промежуточную пространственную группу, роль которой заключается в том, чтобы отдалить лиганд от поверхности сорбента с целью устранения стерических препятствий при взаимодействии с исследуемым белком.

5.3.2. Материалы-носители

Носитель должен быть устойчив к действию биологических и химических факторов. В качестве носителей обычно используют агарозу, целлюлозу, полиакриламидные гели и пористое стекло (кремнезем).

5.3.2.1. Агароза. Агароза — линейный полисахарид, содержащий остатки D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы. Это наиболее распространенный носитель для аффинной хроматографии, об-

ладающий рядом необходимых характеристик, в частности, агароза достаточно стабильна в обычных условиях. Кроме того, агароза выпускается в виде хорошо стандартизованного препарата.

Лиганды и пространственные группы легко присоединяются к агарозе после активации бромоцианом. В литературе приводится ряд модификаций этой методики. Активацию бромоцианом проводят в буферном растворе или в диметилформамиде. В процессе активации поддерживают pH 9—10, подтитровывая щелочью или концентрированным буферным раствором. Для лабораторий, не подготовленных к работе с токсичным бромоцианом (отсутствие приточно-вытяжной вентиляции и вакуумных насосов), выпускается бромоцианактивированная агароза. Однако этот коммерческий препарат не свободен от недостатков. Отметим некоторые из них:

1) *Биодеградация.* Агароза легко разрушается гидролитическими ферментами бактерий, присутствующих в исследуемых растворах. В качестве ингибитора протеаз используют 0,02%-ный раствор азида натрия.

2) *Химическая деградация.* Имеются сведения о том, что химическая связь между носителем и пространственной группой или лигандом гидролизуется под действием аминов, например в присутствии триссодержащих буферов. Аффинный сорбент может также разрушаться в кислой среде при элюировании прочно сорбированных белков.

3) *Неспецифическая сорбция.* Этот недостаток связан со способом активации. Обработка бромоцианом приводит к активации множества гидроксильных групп, однако не все они доступны для молекул лиганда. Избыточные гидроксильные группы инактивируют избытком первичного амина, лизина, этилендиамина. Несмотря на это, может иметь место неспецифическое связывание. Нековалентная сорбция наблюдается также при нанесении на колонку концентрированных растворов белков, например сывороток, экстрактов клеток или семян. Для уменьшения неспецифической сорбции рекомендуется промывать сорбент концентрированными солевыми растворами, однако это может привести к десорбции белков, имеющих низкое сродство к лиганду.

5.3.2.2. Целлюлоза. Этот гетерогенный полимер глюкозы благодаря более низкой неспецифической сорбции, а также наличию простых методов иммобилизации лигандов часто используется для получения иммуносорбентов. Однако по гидродинамическим свойствам целлюлоза уступает другим носителям.

5.3.2.3. Полиакриламид. Преимуществом полиакриламида является низкая неспецифическая сорбция белков. Однако могут

возникнуть трудности на стадии введения пространственных групп или конденсации с лигандом.

5.3.2.4. Пористое стекло. Пористое стекло с различным размером гранул и разнообразной пористостью доступно как коммерческий препарат. Оно обладает достаточно высокими механическими свойствами и проницаемостью, однако характеризуется недостаточной химической устойчивостью, особенно в щелочной среде. Кроме того, в большинстве случаев при хроматографии на пористых стеклах наблюдается неспецифическая сорбция.

5.3.2.5. Нерастворимые белки. Одним из первых типов аффинных сорбентов является полимер, полученный добавлением этилхлороформиата к раствору белка, содержащего лиганд. При перемешивании реакционной смеси на магнитной мешалке выпадает нерастворимый гель в виде мелких частиц [1]. Для повышения гидродинамических свойств гель можно смешать с крупной фракцией сефадекса G-75.

5.3.3. Пространственные группы

Непосредственная конденсация лиганда с носителем может привести к стерическим ограничениям из-за относительной недоступности активных центров исследуемых белков, при этом эффективность аффинной хроматографии значительно снижается. Введение промежуточной пространственной группы увеличивает расстояние между носителем и лигандом и обеспечивает более высокую доступность лиганда. Решающими факторами в определении химической природы и размеров пространственной группы является природа лиганда и носителя.

5.3.4. Лиганд

При выборе лиганда учитывают различные факторы. Лиганд может быть связан с носителем непосредственно или через пространственную группу, причем оба компонента должны быть стабильны. Иммобилизованный лиганд должен связываться с исследуемым веществом достаточно прочно, чтобы обеспечить удаление примесей путем промывки сорбента соответствующим буферным раствором. В то же время связывание должно быть достаточно обратимым, чтобы было возможно элюирование белка в мягких условиях. Выбор оптимального лиганда — наиболее сложная задача, которую удается решить лишь благодаря тщательному анализу положительных и отрицательных свойств намеченных структур.

5.3.5. Конденсация

Способ конденсации лиганда, пространственной группы и носителя определяется свойствами реакционноспособных групп всех трех компонентов аффинного сорбента. Существенно, чтобы реакция конденсации проходила в условиях, обеспечивающих сохранение сродства лиганда к исследуемому белку.

5.4. Адсорбция и элюирование

Перед использованием аффинного сорбента рекомендуется отмыть его от 0,02%-ного азида натрия, который обычно добавляется в коммерческие препараты для предотвращения биодеградации носителя. Примеси белков или свободного лиганда удаляют кратковременной промывкой 1 М раствором уксусной кислоты с последующей тщательной промывкой обычным нейтральным буферным раствором. Перед нанесением образца на колонку необходимо определить специфическую активность исследуемого белка. Концентрацию белка целесообразно определять с помощью иммунохимического метода, например иммуноферментным или радиоиммунным анализом.

Как правило, выделение и очистку мембранных белков проводят в присутствии детергентов. Присутствие дигитонина или додецилсульфата натрия в небольших концентрациях не влияет на эффективность аффинной хроматографии. Однако в каждом конкретном случае необходимо учитывать влияние детергента на процесс сорбции, элюирования и особенно на метод определения биологической активности, применяемый до нанесения образца на колонку. Использование буферных растворов, не содержащих детергентов, может привести к неспецифической сорбции белка на сорбенте вследствие его агрегации, что существенно повлияет на степень очистки.

После нанесения образца колонку промывают сначала нейтральным буферным раствором, затем 3 М раствором NaCl. В полученных фракциях определяют биологическую активность. Следует по возможности избегать разведения полученных при промывке фракций, так как в них может быть обнаружено исследуемое вещество. Причиной этого может быть насыщение колонки или неудачно выбранные условия нанесения. В этом случае полученные фракции повторно наносят на колонку в тех же или иных условиях.

Существенным фактором при подборе условий элюирования является выбор состава элюента для десорбции связанного белка. В качестве элюента можно например, использовать свободный лиганд. Однако на практике этот вариант десорбции встре-

чается достаточно редко ввиду низкой растворимости лигандов в водном буфере или ввиду высокой стоимости лиганда. Кроме того, в случае неспецифической сорбции элюирование свободным лигандом может привести к ошибочным результатам. Более эффективную десорбцию обеспечивают лиганды иного строения, но с аналогичной специфичностью. В качестве элюентов обычно используют ингибиторы или кофакторы ферментов, гаптены, соответствующие фрагментам антигена, иммобилизованного на сорбенте, антагонисты рецепторов гормонов и т. д.

В некоторых случаях для разделения белковых компонентов, характеризующихся различным сродством к аффинному сорбенту, используют элюирование в линейном или ступенчатом градиенте возрастающей концентрации элюента. Для десорбции белков, обладающих сильным сродством к сорбенту благодаря гидрофобным, электростатическим или другим взаимодействиям, рекомендуется вести элюирование в более жестких условиях, например 1 М уксусной кислотой, 6 М мочевиной, 4 М гуанидин-HCl или 2 М роданидом железа. Однако в указанных условиях наблюдается десорбция неспецифически связанных белков, а также денатурация исследуемого белка и потеря его биологической активности. В таком случае следует использовать иммунохимические методы идентификации. Другой недостаток элюирования в жестких условиях касается снижения общего числа хроматографических циклов, которые можно выполнить на данном аффинном сорбенте. Если белки элюируют в сильно денатурирующих условиях, то образец немедленно отделяют от денатурирующей смеси путем диализа. При десорбции в кислотных условиях используют минимальное количество кислоты, а фракции либо немедленно нейтрализуют, либо отбирают в пробирки с рассчитанным количеством нейтрального концентрированного фосфатного буфера.

Для оценки эффективности аффинной хроматографии существенное значение имеет выход исследуемого белка на каждой стадии элюирования. В связи с этим все полученные фракции сохраняют до окончания эксперимента. Выход исследуемого белка может варьировать в широком диапазоне. Добавление белка-носителя приводит к увеличению выхода биологически активного материала, но может также повлиять на степень очистки. При вымывании лиганда с сорбента наблюдается уменьшение выхода сорбированного белка или кажущегося выхода выделяемого биологически активного материала. Степень отщепления лиганда оценивают по содержанию лиганда во фракциях, полученных при промывке сорбента до нанесения образца [8], или по отщеплению радиоактивной метки при использовании радиоактивно меченных лигандов.

Присутствие в образце лиганда протеаз может препятство-

вать определению биологической активности исследуемых белков. Влияние лиганда можно исключить либо разбавлением образца, либо исчерпывающим диализом. Однако на этой стадии может возникнуть опасность денатурации белка. С целью предотвращения деградации белка все операции, включая нанесение, сорбцию, промывку и элюирование, проводят в присутствии ингибиторов протеаз.

5.5. Общие приемы аффинной хроматографии

В случае отсутствия очищенных препаратов высокоспецифичных лигандов используют общие приемы аффинной хроматографии, основанные на применении лигандов с групповой специфичностью. В настоящее время наибольшее распространение получили три типа аффинных сорбентов:

1) иммобилизованные лектины для выделения растворимых или включенных в состав клеточных стенок гликопротеинов;

2) иммобилизованные антитела для получения очищенных препаратов антигенов;

3) иммобилизованные кофакторы ферментов.

5.5.1. Иммобилизованные лектины

Хроматография с использованием иммобилизованных лектинов основана на их избирательном сродстве к различным концевым углеводам или группам углеводов в молекуле гликопротеина. Иммобилизованные конканавалин А или лектин чечевицы используют для специфического выделения гликопротеинов или клеток, содержащих остатки глюкозы или маннозы. Иммобилизованный лимулин применяют для выделения гликопротеинов с высоким содержанием сиаловых кислот. Иммобилизованный агглютинин арахиса проявляет специфичность к гликопротеинам, содержащим N-ацетилгалактозамин, а также к популяциям Т-лимфоцитов на различных стадиях дифференциации. Элюирование проводят концентрированными растворами углеводов с соответствующей специфичностью к данному лектину. Например, для элюирования с иммобилизованного конканавалина А или лектина чечевицы используют α-глюкопиранозид, а в случае иммобилизованного лимулина — сиаловые кислоты.

5.5.2. Иммобилизованные антитела

Так называемый принцип «иммуноадсорбции» был применен в одной из первых работ по аффинной хроматографии. Сначала очищенный антиген, использованный для иммунизации, присо-

единяют к нерастворимому носителю, а затем осуществляют сорбцию специфических антител, содержащихся в сыворотке, на полученном аффинном сорбенте. Десорбцию проводят концентрированным раствором антигена или его фрагментов (гаптенов). В случае отсутствия последних в достаточном количестве для элюирования используют буферные растворы с низким pH, а также растворы, содержащие гуанидин-HCl или мочевину. Такой вариант иммуноаффинной хроматографии приводит к получению гетерогенной популяции антител или лимфоцитов, содержащих антитела. При этом для приготовления иммуносорбента и для элюирования требуется значительное количество очищенного антигена.

В том случае, когда количество исследуемого антигена достаточно только для первоначальной иммунизации, используют другой вариант иммуноаффинной хроматографии, разработанный сравнительно недавно. Полученные антитела иммобилизуют на нерастворимом носителе и экстракт, содержащий антиген, наносят на колонку. Десорбцию осуществляют обычным способом. Однако при приготовлении сорбента, сорбции и элюировании необходимо иметь в виду высокую лабильность антител в присутствии денатурирующих агентов.

Моноспецифичность антител — важный фактор при использовании их в качестве лиганда. Такие антитела можно получить только путем иммунизации животных высокоочищенными препаратами антигена. Недавно был разработан новый более эффективный вариант метода, позволяющий исключить эти трудности. Мышь иммунизируют смесью антигенов, отбирают клетки селезенки, продуцирующие антитела, и проводят слияние с трансформированными клетками миеломы. Таким образом, получают устойчивые гибриды клеток, продуцирующие антитела, так называемые гибридомы. Каждый отдельный клон таких клеток продуцирует антитела только против одной антигенной детерминанты определенного антигена, т. е. обладает строгой моноспецифичностью. Продуцируемые гибридомой моноклональные антитела могут быть получены в больших количествах в трансформированных клетках in vitro или in vivo в брюшной полости мыши. Полученные этим методом антитела использованы для выделения и очистки различных поверхностных антигенов лимфоцитов методом аффинной хроматографии.

Эффективность применения моноклональных антител может быть продемонстрирована на примере выделения общего лейкоцитарного антигена (L-C-антигена) тимоцитов крысы [7]. На первом этапе с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном лектине чечевицы и гель-фильтрации в присутствии дезоксихолата получают частично очищенный препарат мембранного гликопротеина тимоцитов с молекулярной массой

100 000 (400—900-кратная степень очистки). После иммунизации мыши полученным препаратом отбирают клетки селезенки, продуцирующие антитела к L-С-антигену, и получают гибридомы с клетками миеломы. Клоны клеток, продуцирующие моноклональные антитела, отбирают методом непрямого связывания с радиоактивной меткой и ингибирования частично очищенным препаратом антигена. Аффинная хроматография на иммобилизованных моноклональных антителах позволяет получить препарат L-С-антигена с высокой степенью очистки по данным электрофореза. Достаточно высокий выход антигена после элюирования с колонки в работе [7] объясняется тем, что моноклональные антитела взаимодействуют только с одной антигенной детерминантой в молекуле антигена в отличие от обычных антител, специфичных к различным детерминантам. Необходимо также отметить, что моноклональные антитела мыши отличаются более низким сродством к антигену по сравнению с гипериммунными антителами кролика.

5.5.3. Иммобилизованные субстраты, ингибиторы и кофакторы ферментов

Оптимальными лигандами для аффинной хроматографии ферментов являются соответствующие субстраты, однако в общем случае их применению мешает быстрое превращение в продукты ферментативной реакции и как следствие снижение эффективности и деструкция сорбентов. Тем не менее субстраты могут быть использованы в качестве лигандов, если при определенных условиях скорость каталической реакции понижена, а связывание с ферментом остается достаточно сильным. Такие условия могут быть созданы путем понижения температуры (от —2 до —50 °С), когда прочность фермент-субстратного комплекса достаточна для удерживания фермента на колонке, в то время как его десорбция легко достигается при повышении температуры [5].

В более общем случае лигандами служат ингибиторы, а также эффекторы, не затрагивающие при связывании активный центр фермента. Весьма специфическим ингибитором иногда может служить иммобилизованный субстрат. Выбор того или иного ингибитора полностью зависит от соотношения скоростей его ассоциации и диссоциации с ферментом, что определяет условия проведения адсорбции и десорбции.

Для того чтобы избежать необходимости синтеза новых и новых сорбентов, всякий раз, когда требуется выделить тот или иной индивидуальный фермент, были проведены поиски «универсальных» аффинных лигандов. Наиболее подходят для этой цели адениннуклеотидные коферменты, такие, как 5′-АМР, 2′, 5′-ADP, NAD^+, $NADP^+$, поскольку примерно третья часть из

2000 известных ферментов проявляют активность в присутствии кофакторов указанного типа. В качестве структурного аналога NAD^+-содержащих носителей для синтеза сорбентов с групповой специфичностью был использован голубой декстран.

Характерно, что применение групповых лигандов способствовало лучшему пониманию механизма действия кофакторов, а также влияния солей и сопутствующих белков, определяющих силу биоспецифического взаимодействия и условия адсорбции и элюирования фермента. Таким образом, несмотря на сравнительно низкую специфичность групповых лигандов, путем подбора соответствующих условий можно достичь высокой степени очистки выделяемого фермента.

Изящный вариант «каскадной» методики такого типа был продемонстрирован недавно на примере выделения цитрат-синтетазы (К.Ф. 4.1.3.7) и фумаразы (К.Ф. 4.2.1.2) с использованием одной и той же аффинной колонки, содержащей пиромеллитовую кислоту (ПМК), присоединенную к сефарозе 4В через пространственную группу диаминопропанола. Экстракт ткани наносят на колонку с ПМК-сефарозой 4В в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,3), содержащем 0,01 М меркаптоэтанол. Цитрат-синтетаза сорбируется полностью, в то время как связывание фумаразы в присутствии фосфата подавляется (фосфат — конкурентный ингибитор этого фермента). Цитрат-синтетазу элюируют тем же буфером, содержащим 0,01 М лимонную кислоту. Полученный элюат наносят на колонку с гелем голубой сефарозы 4В, где фермент связывается количественно, и далее элюируют 0,01 М фосфатным буфером (pH 7,3), содержащим меркаптоэтанол (но не содержащим лимонной кислоты). Фракцию фумаразы, не сорбированную на ПМК-сефарозе 4В в условиях элюирования фосфатом и содержащую 100% ферментативной активности, подвергают диализу против 0,01 М трис-ацетатного буфера (pH 7,3), содержащего 0,014 М меркаптоэтанол и наносят на колонку с ПМК-сефарозой 4В в указанном буфере. При этом наблюдается количественное связывание фермента, элюирование которого проводят в присутствии L-яблочной кислоты и далее, после удаления последней, фумаразу сорбируют на колонке с голубой сефарозой, а затем проводят элюирование, вновь добавляя яблочную кислоту в рабочий трис-ацетатный буфер.

5.6. Примеры

5.6.1. Выделение и очистка антител

Аффинная хроматография успешно применяется для выделения и фракционирования популяции антигенов, характеризующихся структурной гетерогенностью. Например, после гипериммунизации кролика обработанными форма-

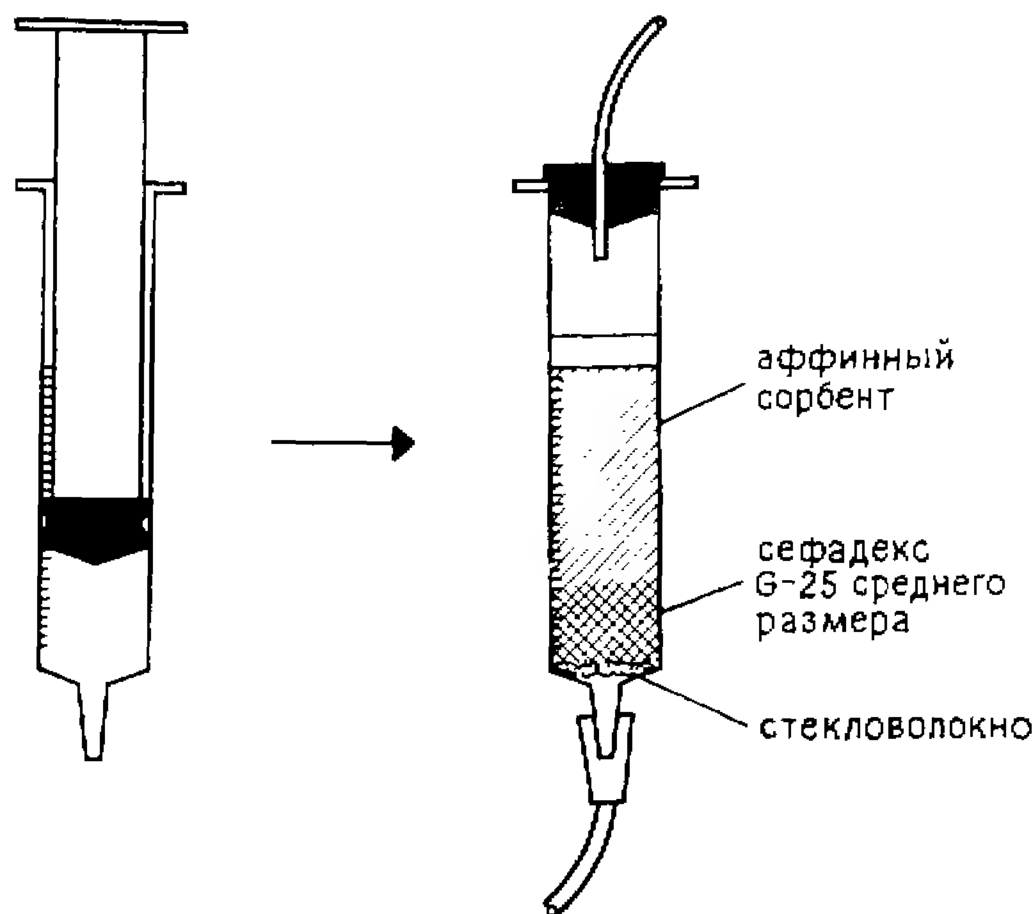


РИС. 5.3. Простой способ изготовления колонки для аффинной хроматографии.

линном микроорганизмами *Pneumococcus* (штамм VIII) были получены антитела, специфические к антигену клеточной стенки, и синтезирован ряд иммунных сорбентов на основе полисахарида из клеточных стенок. Наиболее простой способ получения сорбента заключается в конденсации полисахарида с сефарозой 4В после введения аминогрупп в одно из этих соединений, имеющих полисахаридную природу. Активация бромоцианом неаминированного компонента и его взаимодействие с полиаминопроизводным приводит к получению сорбента. Обработка таких сорбентов в кислой и щелочной средах позволяет получить ряд аффинных сорбентов, которые могут быть использованы для разделения различных популяций антител.

В то же время было показано, что прямая конденсация нативного антигена на носителе приводит к получению сорбента со слишком сильным сродством и элюирование антител возможно только в жестких условиях [4], например в присутствии 6 М гуанидин-HCl. В таких условиях наблюдается денатурация или нежелательные изменения в структуре антител. Для уменьшения сродства аффинных сорбентов в качестве исходного материала целесообразно использовать клеточные стенки родственных микроорганизмов, дающих перекрестную реакцию с исследуемым микроорганизмом, или изменить структуру исходного полисахарида путем обработки в кислых или щелочных условиях, аминированием и т. п.

На рис. 5.2 приведен простой способ изготовления аффинной колонки на основе обыкновенного шприца объемом 5 мл. Стенки шприца обрабатывают ацетоном, резиновый наконечник поршня используют в качестве верхней насадки. Перед заполнением колонки аффинным сорбентом (3 мл) на слой стекловолокна помещают 2 мл сефадекса G-25 среднего размера. Слой сефадекса препятствует смешиванию аффинного сорбента со стекловолокном.

Полученный сорбент проверяют на примере хроматографии функции иммуноглобулинов, выделенной из сыворотки путем высаливания сульфатом аммония. Элюирование специфически сорбированных антител проводят, последовательно сменяя различные буферные растворы. С целью оценки эффективности полученного аффинного сорбента на каждой стадии подсчитывают выход иммуноглобулинов. Для постепенной десорбции различных фракций

антител обычно используют плавный градиент концентрации соли, гаптена или обоих компонентов. На завершающем этапе сорбент, как правило, промывают кислотным буфером (0,2 М глицин-HCl, pH 2,2) или растворами 6 М мочевина-HCl или 4 М гуанидин-HCl. Следует обратить внимание на необходимость немедленной нейтрализации и промывки сорбента после элюирования, а также нейтрализации и диализа полученных белковых фракций.

Концентрированные солевые растворы, например 3 М NaCl, не относят к специфическим элюентам, но они могут быть использованы для ослабления электростатических взаимодействий между антителами и иммобилизованным на носителе антигеном. В качестве более специфичных элюентов используют гаптены, например моносахариды (фукоза, манноза), дисахариды (целлобиоза, лактоза) или смесь олигосахаридов, полученных в результате мягкого кислотного гидролиза полисахарида.

5.6.2. Очистка рецепторов гормонов

Рецепторы гормонов являются минорными компонентами плазматической мембраны клетки, и в связи с этим для их выделения необходимо располагать высокоспецифическим методом. Применение аффинной хроматографии в этом случае более предпочтительно, так как метод основан на использовании функциональных, а не общих физико-химических свойств рецепторов. Однако для успешного применения аффинной хроматографии следует принимать во внимание следующие рекомендации:

1) необходимо исключить неспецифическое взаимодействие рецепторов и других белковых компонентов с пространственной группой или материалом-носителем, затрудняющее биоспецифическую десорбцию свободным лигандом и снижающее степень очистки рецептора;

2) иммобилизованный лиганд должен узнавать специфический участок рецептора и связываться с ним. Этот критерий приобретает особое значение при использовании низкомолекулярных лигандов (стероидов, холинэргических и адренэргических наркотиков), так как возможно взаимодействие групп лиганда, участвующих в связывании с рецептором, с пространственной группой носителя. Такое взаимодействие может значительно изменить химические, физические и пространственные характеристики лиганда и таким образом существенно снизить специфическое связывание;

3) элюирование рецептора с аффинного сорбента проводят в мягких условиях, причем константа связывания (ассоциации) должна быть выше 10^9—10^{10} М/л. Обработка в жестких условиях приводит в большинстве случаев к потере биологической активности (часто это единственный параметр, по которому определяют содержание рецептора);

4) для количественного определения рецептора необходимо использовать простую методику, легко воспроизводимую в различных условиях.

Далее приводится анализ синтеза различных аффинных сорбентов для очистки рецептора катехоламина из плазматических мембран эритроцитов индюка. Этот рецептор находится в тесном взаимодействии с аденилатциклазной системой. Агонистами являтся эпинефрин или изопреналин (изопротеринол), антагонистами — альпренолол или пропранолол. В обоих случаях происходит быстрое и обратимое связывание.

Первые попытки получить эффективный сорбент были осуществлены путем прямого присоединения норэпинефрина к агарозе или через аминогруппу агониста к пространственной группе агарозы [6]. Однако очистка на таких сорбентах невозможна вследствие блокирования аминогруппы, которая играет основную роль в фармакологической активности агониста.

По другому варианту катехоламины присоединяют с помощью ароматического кольца к диазотированным пространственным группам кремнезема (макропористого стекла). Иммобилизованный гормон активизирует аденил-

атциклазную систему в тканях, клетках и плазматических мембранах [10]. Однако дополнительные исследования показали, что участки связывания [^{3}H]норэпинефрина не идентичны участкам связывания β-адренэргического рецептора [11]. Биологическая активность, приписываемая гранулам кремнезема, связана с присутствием свободного лиганда в препарате кремнезема, которое можно объяснить, в частности, как результат гидролиза связи лиганд — носитель в присутствии веществ, содержащих аминогруппы, например трис-HCl или альбумина.

Описан синтез трех классов аффинных сорбентов и исследованы их следующие свойства: высвобождение свободного лиганда из гранул сорбента, эффективность сорбции рецепторов и степень неспецифической сорбции [9] (табл. 5.1):

1) агонист изопротеренол присоединен через ароматическое кольцо к диазотированным пространственным группам агарозы (сорбент I);

2) агонист норэпинефрин присоединен через боковые группы этаноламина с помощью амидной связи (сорбент II);

3) антагонист альпренолол обрабатывают N-бромосукцинимидом и полученный бромогидрин конденсируют с тиолгруппами пространственных групп агарозы (сорбент III). Адсорбционные характеристики указанных сорбентов приведены в табл. 5.1.

Сорбент I удерживает 62% рецепторов и 25% солюбилизированных белков. Соответствующий конъюгат пространственная группа — агароза (сорбент IV) удерживает 67% рецепторов и 23% белков. Таким образом, наблюдаемый процесс связывания рецепторов в большей степени обусловлен структурой пространственной группы, чем свойствами иммобилизованного лиганда. Аналогичное явление наблюдается при сравнении сорбентов, содержащих иммобилизованный с помощью аминогрупп норэпинефрин (сорбент II). Сорбент II и соответствующий конъюгат пространственная группа — агароза удерживают 35% и 22% рецепторов и 12% и 9% белков. Анализ адсорбционных свойств различных конъюгатов пространственная группа — агароза показал, что пространственная группа, содержащая ароматическое кольцо и диаминодипропиламиногруппу (сорбент IV), сорбирует наибольшее количество (—)-[^{3}H]дигидроальпренололсвязывающих участков и белка. Такое специфическое связывание значительно снижается при замене ароматической группы на метильную (сорбент V) и увеличении гидрофильности алифатического компонента пространственной группы (т. е. путем замены диаминодипропиламиногруппы на N-ацетилдиаминопропан-2-олгруппу, сорбент VI). Ацетамидное и N-ацетилцистамидное производные диаминопропан-2-олагарозы (сорбенты VII и VIII) являются практически инертными. Эти данные свидетельствуют о том, что присутствие ароматического кольца или гидрофобных участков в пространственной группе приводит к увеличению неспецифического связывания β-рецепторов и белков. Сорбент III связывает 88% рецепторов, а соответствующая пространственная группа (сорбент VIII) удерживает лишь 4%. Оба сорбента связывают 9% и 6% белка.

Из трех классов аффинных сорбентов только конъюгат альпренолол-агароза (сорбент III) обладает необходимыми адсорбционными свойствами: удерживает наибольшее количество рецепторов и незначительное количество белка. Процесс адсорбции на этом сорбенте биоспецифичен, т. е. обусловлен взаимодействием с иммобилизованным альпренололом, а не с пространственной группой. С использованием радиоактивно меченых пространственной группы или антагониста установлено, что на стадии инкубации с рецептором не происходит отщепления свободного или связанного с пространственной группой лиганда: фракции, полученные при обработке сорбентов буфером или дигитониновым экстрактом, не ингибируют связывание (—)-[^{3}H]дигидроальпренолола со свежевыделенными мембранами.

Сорбент III был использован для выбора оптимальных условий очистки рецептора катехоламина из мембран эритроцитов индюка в статических ус-

Табл. 5.1. Сорбция солюбилизированных β-рецепторов и белков агонистами, антагонистами катехоламинов и пространственными группами, иммобилизованными на агарозе. Дигитониновый экстракт эритроцитарных мембран (0,9 мл) инкубируют с 100 мг каждого сорбента при 30 °С в течение 10 мин. В супернатантных фракциях, полученных после центрифугирования, определяют (—)-[^{3}H]дигидроальпренололсвязывающую активность и содержание белка. Степень сорбции определяют как разность между активностью и содержанием белка в исходном дигитониновом экстракте и в полученных супернатантных фракциях. (ИП) — изопротеренол, НЭ — норэпинефрин и АП — альпренолол. Немодифицированная агароза сорбирует <2% солюбилизированных рецепторов и белков [9].

Сорбент	Носитель	Пространственная группа	Лиганд	Степень сорбции, %: для рецепторов	Степень сорбции, %: для белков
I	агароза	$NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH-C(=O)-C_6H_4-N_2-$	$C_6H_2(OH)_2-CHOH-CH_2-NH-CH(CH_3)_2$ (ИП)	62	25
II	агароза	$NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH-C(=O)-CH_2-CH_2-C(=O)-$	$NH-CH_2-CHOH-C_6H_3(OH)_2$ (НЭ)	35	12
III	агароза	$NH-CH_2-CHOH-CH_2-NH-C(=O)-CH(NH-CO-CH_3)-CH_2-CH_2-S-$	$CH_2-CHOH-CH_2-C_6H_4-O-CH_2-CHOH-CH_2-NH-CH(CH_3)_2$ (АП)	88	9
IV	агароза	$NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH-C(=O)-C_6H_4-NO_2$		67	23
V	агароза	$NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH-C(=O)-CH_3$		22	9
VI	агароза	$NH-CH_2-CHOH-CH_2-NH-C(=O)-C_6H_4-NO_2$		30	16
VII	агароза	$NH-CH_2-CHOH-CH_2-NH-C(=O)-CH_3$		8	0
VIII	агароза	$NH-CH_2-CHOH-CH_2-NH-C(=O)-CH(NH-CO-CH_3)-CH_2-CH_2-SH$		4	6

ловиях, на колонке или сочетанием обоих методов: сорбцию проводят в статических условиях с последующей промывкой и элюированием на колонке. Показано, что использование смешанного метода анализа полученных фракций является предпочтительным, так как значительно упрощает процесс промывки и позволяет также стандартизировать процесс элюции. Далее приводится детальное описание этой методики.

Очищенный препарат солюбилизированных дигитонином мембран, содер-

жащий 1,5 мг белка или 4 пкмоля рецептора в 1 мл, наносят на 0,5 мл аффинного сорбента, помещенного в колонку, которую промывают 3 мл 0,01 *М* трис-HCl буфера, содержащего 0,09 *М* NaCl. Процесс нанесения и сорбции проводят в термостатированных условиях (30 °С), а затем промывают 2 мл буфера, содержащего 1 *М* NaCl. Элюирование проводят 5 мл концентрированного раствора [^{3}H]дигидроальпренолола, содержащего или 1 *М* NaCl, или, согласно более поздним работам, 0,05% дигитонина. Рецепторную активность определяют либо методом осаждения полиэтиленгликолем на стекловолоконных фильтрах [9], либо методом гель-фильтрации на сефадексе G-150, на котором происходит отделение радиоактивной метки от несвязанного лиганда.

Использование сорбента III позволяет осуществить 20 000-кратную очистку рецепторов плазматической мембраны эритроцитов за один хроматографический цикл. Выход составляет 25—30%. Метод был также успешно применен для очистки β-рецептора эритроцитов лягушки [3].

5.7. Стратегия очистки редких белков

Обзор литературных данных и результатов, полученных авторами, позволяет констатировать, что наиболее эффективная стратегия выделения редких белков должна включать следующие стадии:

1) получение малых количеств редкого белка с помощью специфической аффинной хроматографии с использованием нативного или синтетического лиганда с последующим определением биологической активности;

2) иммунизация мышей полученным материалом;

3) получение моноклональных антител с использованием спленоцитов иммунизированных мышей;

4) препаративная иммуноаффинная хроматография выделяемого белка на носителе, содержащем специфические моноклональные антитела.

Литература

1. *Avrameas S., Ternynck T.*, J. Biol. Chem., **242**, 1651—1659 (1967).
2. *Beeckmans S., Kanarek L.*, Eur. J. Biochem., **117**, 527—535 (1981).
3. *Caron M. G., Srinivasa Y., Pitha J., Kocolek K., Lefkowitz R. J.*, J. Biol. Chem., **254**, 2923—2927 (1979).
4. *Cheng W. C., Fraser K. J., Haber E.*, J. Immunol., **111**, 1677—1689 (1973).
5. *Douzou P.*, Trends Biochem. Sci., **1**, 25—27 (1976).
6. *Lefkowitz R. J., Haber E., O'Hara D.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 2828—2832 (1972).
7. *Sunderland C. A., McMaster W. R., Williams A. F.*, Eur. J. Immunol., **9**, 155—159 (1979).
8. *Vauquelin G., Geynet P., Hanoune J., Strosberg A. D.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 3710—3714.
9. *Vauquelin G., Geynet P., Hanoune J., Strosberg A. D.*, Life Sci., **23**, 1791—1796 (1978).
10. *Venter J. C., Ross J. Jr., Kaplan N. O.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**, 824—828 (1975).
11. *Yong M. S.*, Science, **182**, 157—158 (1973).

Рекомендуемая литература

Hoffman-Osterhof O., Breitenbach M., Koller F., Kraft D., Scheiner A. (Eds.), Affinity Chromatography, Pergamon, Oxford, 1978.
Jacoby W. B., Wilchek M. (Eds.), Methods in Enzymology, vol. 34, Affinity Techniques, Enzyme Purification, part B, Academic Press, New York, 1974.
Lowe C. R., An Introduction to Affinity Chromatography, North-Holland, Amsterdam, 1979.
Lowe C. R., Dean P. D. G., Affinity Cheomatography, Wiley, London, 1974.
Schott H., Affinity Chromatography, Chromatographic Science Series, vol. 27, Marcel Dekker, New York and Basel, 1984.
Scouten W. H., Affinity Chromatography, Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto (1981).
Wilchek M., Hexter C. S., in: Methods of Biochemical Analysis, vol. 23, Glick D. (Ed.), Wiley, New York, 1976, pp. 347—385.

Глава 6

РАЗДЕЛЕНИЕ СМЕСЕЙ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

М. Д. УОТЕРФИЛД (M. D. WATERFIELD, *Protein Chemistry Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, Lincoln's Inn Fields, London WC23A 3PX, U.K.*)

6.1. Введение

Появление новой аппаратуры для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) значительно расширило возможности очистки белков и пептидов с целью их последующего функционального и структурного изучения. Используемые в настоящее время сорбенты позволяют проводить разделение чаще всего по одному из следующих признаков: размеры молекул, заряд, гидрофобность.

Фракционирование по размеру разделяемых молекул (гель-хроматография) происходит при перемещении по колонке в потоке элюента смеси веществ разного молекулярного веса; при этом внутренний объем пор частиц сорбента доступен лишь молекулам, имеющим размеры, не превышающие диаметр пор. Эти молекулы участвуют в процессе распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами системы. В отличие от них молекулы, не проникающие внутрь гранул сорбента, слабо участвуют в процессах распределения и элюируются быстрее малых молекул.

В адсорбционной хроматографии результат разделения определяется процессами сорбции — десорбции молекул на поверхности носителя. Сорбция обусловлена совокупностью взаимодействий молекул разделяемых веществ и растворителей с поверхностью сорбента (дипольные взаимодействия, водородные связи, вандерваальсовы силы, ионные взаимодействия). В ходе разделения молекулы растворенного вещества и растворителя конкурируют с участками связывания на поверхности адсорбента. Степень сорбции вещества можно регулировать, меняя либо характеристики распределяемого вещества (например, заряд присутствующих в растворе частиц), либо свойства элюента. В результате этих изменений происходит конкурентное образование (или разрушение) множественных контактов между растворенным веществом, растворителем и сорбентом.

Силы гидрофобного взаимодействия проявляются в распределительной обращенно-фазовой (ОФ) хроматографии, прово-

димой на носителях с химически привитыми гидрофобными остатками C_8, C_{18}.

Реальные хроматографические процессы проходят по смешанным механизмам. Например, современные колонки для гель-хроматографии заполнены отнюдь не инертным сорбентом и разделение в них происходит не только по размеру молекул, но включает и адсорбцию, и распределение.

Благодаря появлению ОФ-хроматографии стало возможным проводить разделения веществ быстро и с высокой эффективностью. В последнее время в литературе часто описываются методики ОФ-разделения больших пептидов. Очевидно, дальнейшие достижения в этом направлении зависят от успехов в разработке новых носителей.

Для препаративной и даже для промышленной ВЭЖХ пептидов имеется коммерческое оборудование. Появились также высокочувствительные микроколоночные системы, предназначенные для анализа следовых количеств вещества. Большинство современных приборов не рассчитано на работу при малых скоростях потока, необходимых при разделениях на микроколонках. Однако нет сомнения в том, что вскоре появятся методы разделения пикомольных количеств пептидов и белков.

Информативность анализа резко повышается при использовании детекторов, имеющих диодную линейку. Эти детекторы способны быстро (до 10 раз/с) сканировать спектры компонентов, элюируемых с колонки; включение в установку также мини- или микрокомпьютеров нового поколения позволяет контролировать чистоту разделяемых веществ и проводить селективное определение пептидов и белков, обладающих уникальными характеристиками поглощения.

Кроме того, можно ожидать, что в недалеком будущем будут созданы комплексы, включающие масс-спектрометр и микроколоночный хроматограф, что позволит не только обнаруживать небольшие пептиды, но и определять их структуру.

6.2. Гель-хроматография

При использовании мягких гелей (сефадекс, биогели) разделение по размерам молекул занимает много времени. Появление жестких носителей для гель-хроматографии дало возможность сократить время, необходимое для разделения белков и пептидов этим методом. Применение сорбентов, устойчивых к сжатию (ультрагель, сефароза), помогло добиться большей эффективности разделения, проводимого в обычных (насыпных) колонках.

Для получения носителей, обладающих параметрами, необходимыми для высокоэффективной гель-хроматографии, фирмы-

производители ищут способы получения сорбентов в форме однородных частиц малого диаметра (5—10 мкм), имеющих небольшой разброс размера пор (не более нескольких процентов).

Поведение белка (пептида) в ходе гель-хроматографии зависит от физических и химических свойств образца, элюента и, конечно, типа используемого носителя.

6.2.1. Параметры разделения

Обзор физических параметров разделения можно найти в работах [19, 33]. Рассмотрим основные понятия гель-хроматографии. Общий объем подвижной фазы V_t складывается из объема внутри частиц V_i и объема, заключенного между частицами сорбента V_0, упакованного в колонке. Перемещение растворителя внутрь пор и наружу происходит по законам диффузии. Распределение растворенного вещества между внутренним и внешним объемами растворителя определяется коэффициентом распределения K_D:

$$K_D = V_e - V_0/V_i = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$$

где V_e — объем элюирования данного вещества, V_0 — свободный объем (занимаемый жидкостью между частицами носителя), V_t — общий объем подвижной фазы.

Молекулы, размер которых не позволяет им проникать в поры сорбента и вступать в равновесие с жидкостью, находящейся в порах ($K_D=0$), элюируются в объеме $V_e=V_0$. Небольшие молекулы, проникающие в поры ($K_D=1$), выходят из колонки в виде одного пика в объеме V_e, равном общему объему V_t. K_D может меняться в пределах $0 \leqslant K \leqslant 1$. Большие молекулы проходят через колонку быстрее маленьких. В идеальном случае минимальный объем элюирования равен V_0, а максимальный — V_0+V_i. Свободный объем V_0 можно найти экспериментально, пропуская через колонку вещества, размер молекул которых не позволяет проникать в поры, например ферритин (M $467 \cdot 10^3$) или декстран голубой (M $2 \cdot 10^6$). Общий объем V_t можно определить, хроматографируя инертные низкомолекулярные вещества ([^{14}C]глюкозу или ^3H_2O), не взаимодействующие с матрицей носителя. Следует помнить, что использование небольших пептидов или модифицированных аминокислот (например, ДНФ-Lys) для измерения V_t может привести к неверным результатам из-за взаимодействия этих веществ с сорбентом. Степень разделения K двух веществ описывается следующим уравнением (p — ширина пика):

$$K = \frac{V_{e(2)} - V_{e(1)}}{2(p_1 + p_2)}$$

Эффективность колонки оценивается с помощью такого понятия, как высота, эквивалентная теоретической тарелке

(ВЭТТ). Этот термин заимствован из теории процессов разделения, которые можно провести в виде отдельных стадий.

Поскольку в хроматографическом процессе фазы находятся в постоянном движении, то высоту колонки, эквивалентную теоретической тарелке, определяют лишь расчетным путем. ВЭТТ или общее число теоретических тарелок вычисляют по результатам хроматографии эталонных соединений. Фирмы, производящие колонки, часто используют в качестве эталонов вещества, отличающиеся от применяемых в лаборатории. Число теоретических тарелок зависит от природы используемого эталона, характеристик колонки, рабочих условий; поэтому сравнивая колонки разных фирм, надо проявлять осторожность при оценке опубликованных результатов разделения. По мере разработки все более эффективных коммерческих сорбентов и методов упаковки ВЭТТ уменьшается, что повышает общее число тарелок в колонке.

В уширение полосы вносят вклад несколько физических факторов (относительно химических см. разд. 6.2.2); среди них — линейная скорость подвижной фазы, вихревая диффузия, вызываемая нарушением потока фазы по мере прохождения через слой частиц, продольная диффузия. Использование частиц малого размера (5—10 мкм), имеющих незначительный разброс по диаметру частиц и по размерам пор, в сочетании с хорошей упаковкой колонки помогает уменьшить размывание зон. Последнее явление вызывается также пристеночными эффектами, и поэтому увеличение диаметра колонки до 7,5—8,0 мм снижает влияние этих эффектов. При выборе колонки надо искать компромисс между стоимостью упакованного носителя и размерами колонки (длина, диаметр).

Поскольку коэффициент диффузии для больших белков существенно меньше, чем для пептидов, то для белков увеличение линейной скорости подвижной фазы гораздо сильнее влияет на ширину зоны и на эффективность колонки, чем в случае пептидов. Увеличение длины колонки положительно сказывается на ее эффективности только при оптимальной скорости потока (относительно кажущегося размера молекул анализируемых соединений). Колонки для гель-фильтрации, производимые разными фирмами, имеют различные (рекомендуемые фирмами) оптимальные скорости потока для разделения смеси одних и тех же белков. Например, в инструкции фирмы Toyo Soda для колонки Blue column, продаваемой фирмой LKB, рекомендуемая скорость потока составляет ~0,05 мл/мин. Такую малую скорость подачи растворителя не могут обеспечить большинство насосов многих фирм, и работа при таких объемных скоростях ведет к удлинению времени анализа. Оптимальная скорость для колонки I-125 (фирмы Waters) составляет

0,25 мл/мин (по опыту нашей лаборатории). На разделяющую способность влияет также отношение общего объема пор V_i к свободному объему колонки V_0: чем больше отношение V_i/V_0, тем лучше разделение. Проще всего для увеличения отношения V_i/V_0 удлинить колонку; для большинства разделений длина колонки 600 мм оказывается достаточной. При приобретении колонок для гель-фильтрации рекомендуется сравнивать продукцию разных фирм, используя указанное отношение.

6.2.2. Химические факторы

Гели на основе полисахаридов или полиакриламида, используемые в обычной гель-фильтрации, очень слабо взаимодействуют с белками и пептидами. Иная картина наблюдается при работе на носителях, применяемых в ВЭЖХ.

На поверхности сорбентов на основе диоксида кремния присутствуют кислые силанольные группы, которые могут взаимодействовать как с положительно заряженными группами белка, вызывая его адсорбцию, так и с отрицательно заряженными группами, что приводит к отталкиванию молекул белка. В результате таких взаимодействий снижается эффективность проникновения молекул в поры геля. Для предотвращения этого силанольные группы модифицируют нейтральными соединениями, содержащими гидрофильные цепи. Обычно модификация бывает неполной, и поэтому непрореагировавшие силанольные или другие заряженные группы влияют на элюирование белка, и степень этого влияния зависит от состава подвижной фазы и p*I* данного белка.

В настоящее время чаще всего используются колонки двух фирм Waters (колонки для анализа белка I-60, I-125, I-250) и Toyo Soda серии TSKSW (2000, 3000, 4000), продаваемые по лицензиям многими фирмами. Кроме того, существуют колонки Synchropak GPC (Synchrom), Lichrosorb и Lichrosphere DIOL (Merck), Glycophase GPC (Pierce), Aquapore-OH (Brownlee). Superose (Pharmacia) и Spheron (Lachema).

Проводилась оценка колонок с учетом влияния химических факторов, особенно в отношении сорбента Synchropak [19]. Опубликованы результаты детального исследования колонок Lichrospere DIOL [27]. Выводы, полученные при изучении этих колонок, в разной степени применимы к колонкам других фирм. Следует иметь в виду, что для предотвращения разрушения носителя колонки на основе диоксида кремния следует использовать только при $2<pH<7,7$.

Влияние ионной силы на объемы элюирования четырех белков, имеющих разные p*I*, показано на рис. 6.1. Хроматографическому разделению подвергались пепсин (p*I* 1), лизоцим (p*I* 11,0), овальбумин (p*I* 4,7), химотрипсиноген (p*I* 9,5); рабо-

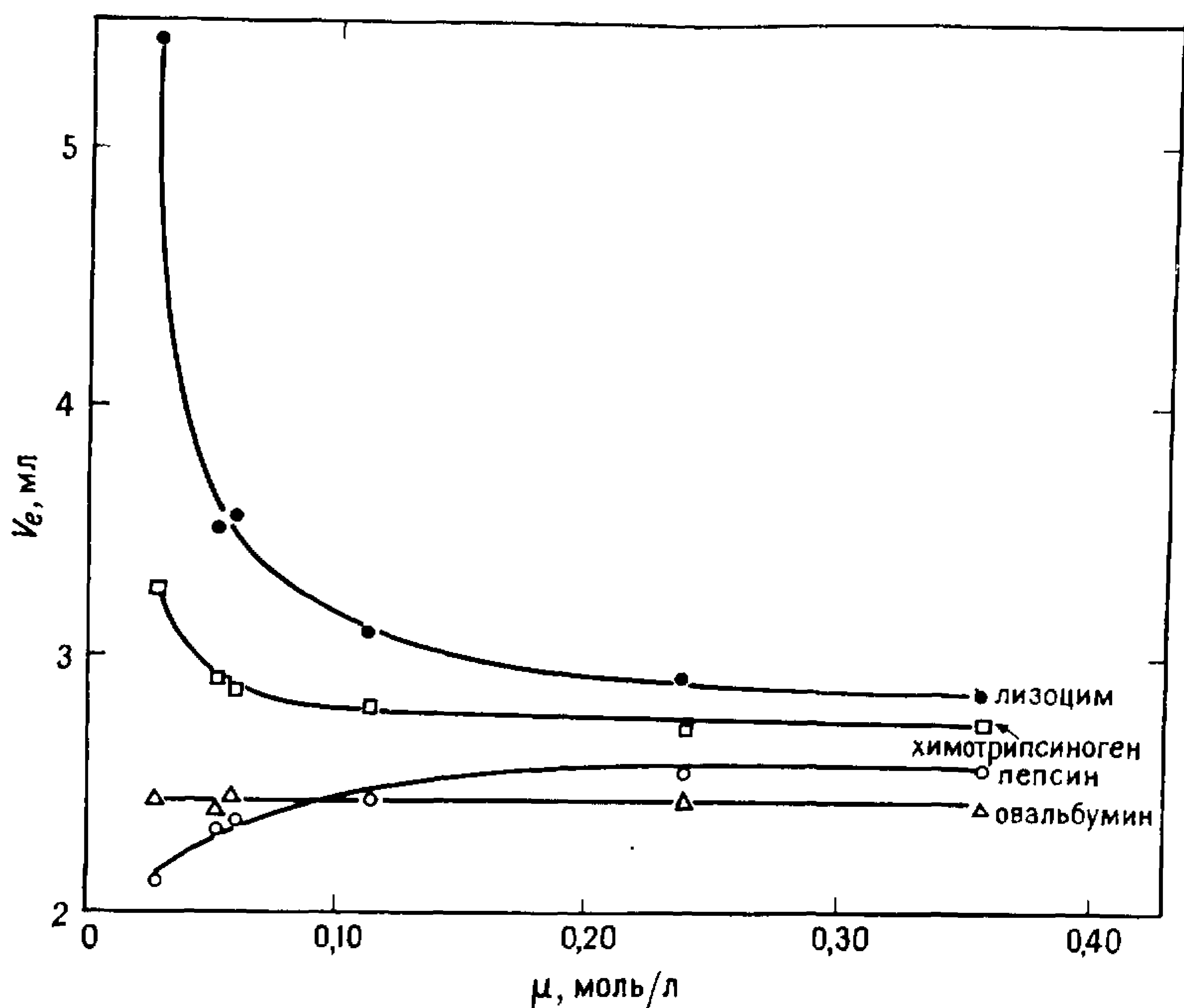


РИС. 6.1. Влияние ионной силы на объемы элюирования белков с различными значениями р*I* при гель-хроматографии на колонке Lichrosorb DIOL. Ионную силу создавали при помощи ацетата и сульфата натрия при pH 5 [27].

та проводилась на Lichrosphere DIOL при pH 5. По мере увеличения ионной силы снижалось влияние ионного отталкивания на кислый белок пепсин и ионной адсорбции — на основные белки-химотрипсиноген и лизоцим, тогда как объем элюирования овальбумина (р*I* 4,7) остался неизменным. Для солей, создающих более высокую ионную силу(при одинаковых молярных концентрациях), подавление ионных эффектов носителя выражено сильнее, чем для растворов с меньшей ионной силой (например, фосфат более эффективен по сравнению с ацетатом).

При отсутствии взаимодействия между сорбентами и белком должна наблюдаться линейная зависимость между логарифмом молекулярной массы и объемом элюирования, что подтверждается для колонки Lichrosphere DIOL (рис. 6.2) [27]. В этом случае анализ проводили в растворе с ионной силой $\mu = 0{,}36$ моль/ /л. Из данных, представленных на рис. 6.2, следует, что лизоцим и химотрипсиноген при указанной ионной силе элюируются в объеме, не соответствующем общей закономерности [27]. Такое отклонение отчасти можно объяснить гидрофобными взаимодействиями, так как добавление этиленгликоля к подвиж-

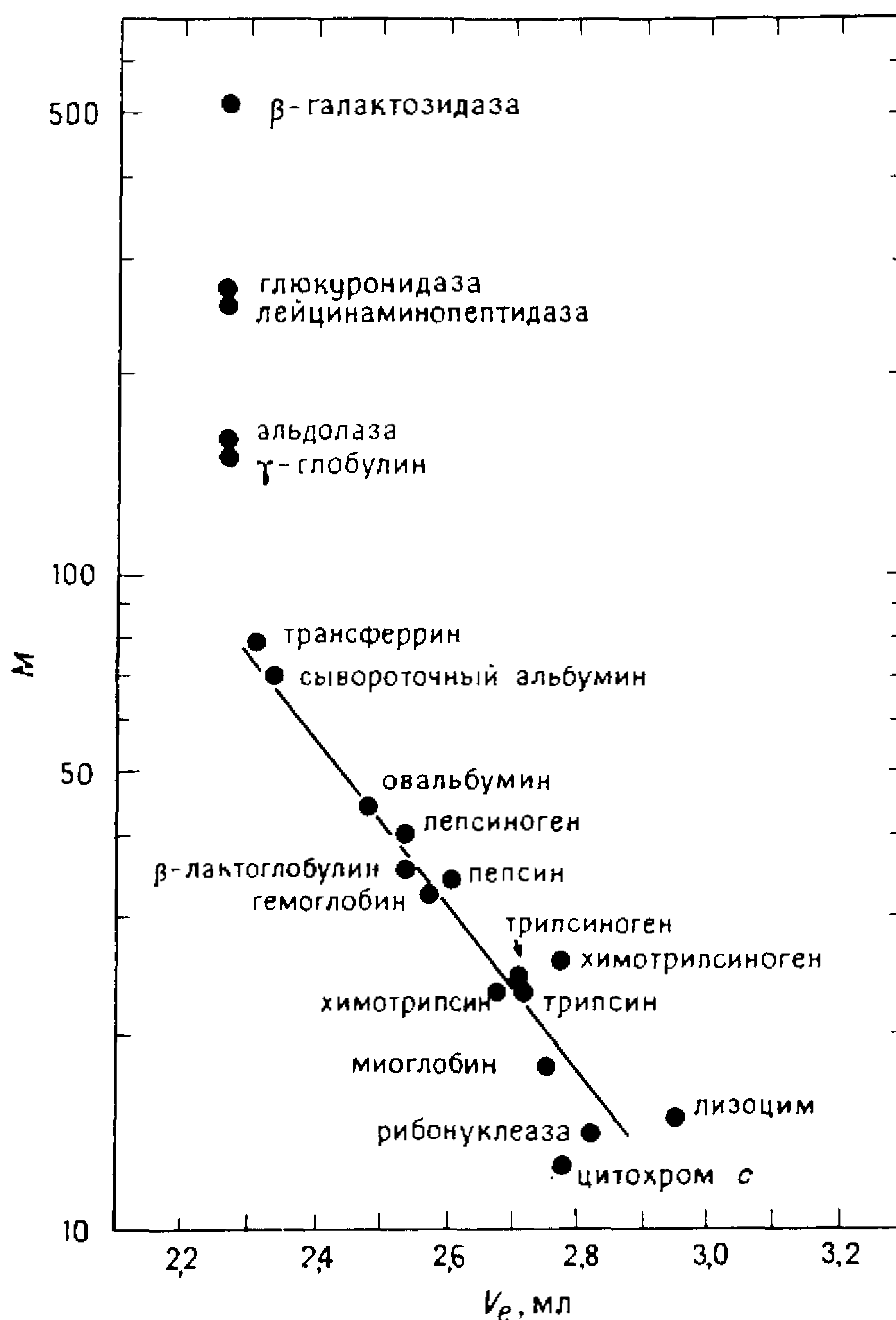


РИС. 6.2. Корреляция объемов элюирования и кажущихся молекулярных масс разных белков при гель-хроматографии. Условия анализа см. в подписи к рис. 6.1 (ионная сила 0,36 моль/л) [27].

ной фазе снижает V_e. Наблюдаемое аномальное элюирование цитохрома *c* и гемоглобина связано с агрегацией белков. Так, для цитохрома *c* (0,05 *M* фосфат натрия, 0,1 *M* хлорид натрия, pH 7,5) V_e соответствует *M* $12{,}5 \cdot 10^3$, тогда как при pH 5 (0,1 *M* ацетат натрия) V_e коррелирует с *M* $20 \cdot 10^3$. Для сравнения приведены также градуировочные графики для разделения некоторых эталонных белков (с указанием условий разделения) на колонках Synchropak GPC, Waters (серия I), Toyo Soda (рис. 6.3—6.5).

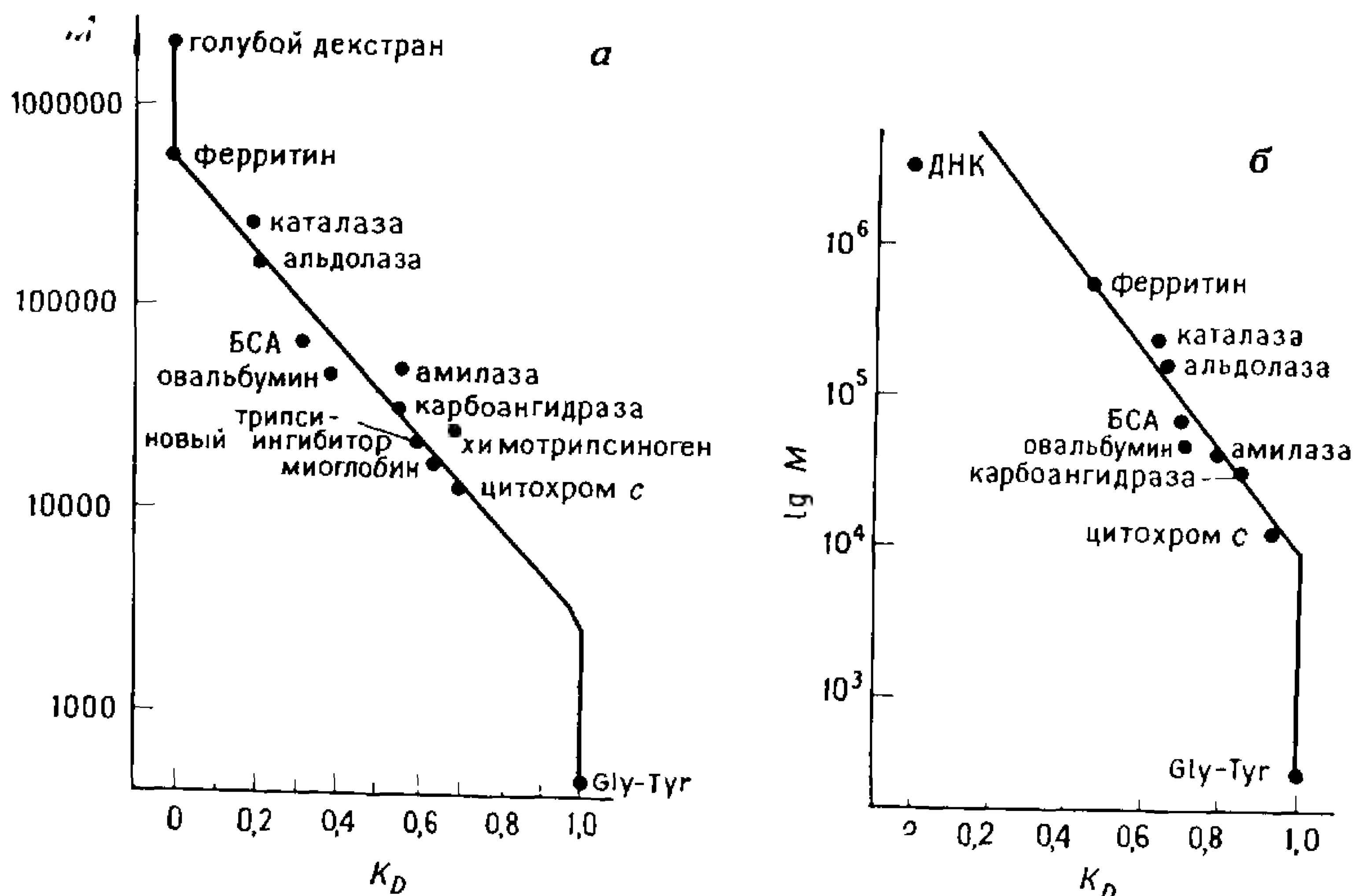
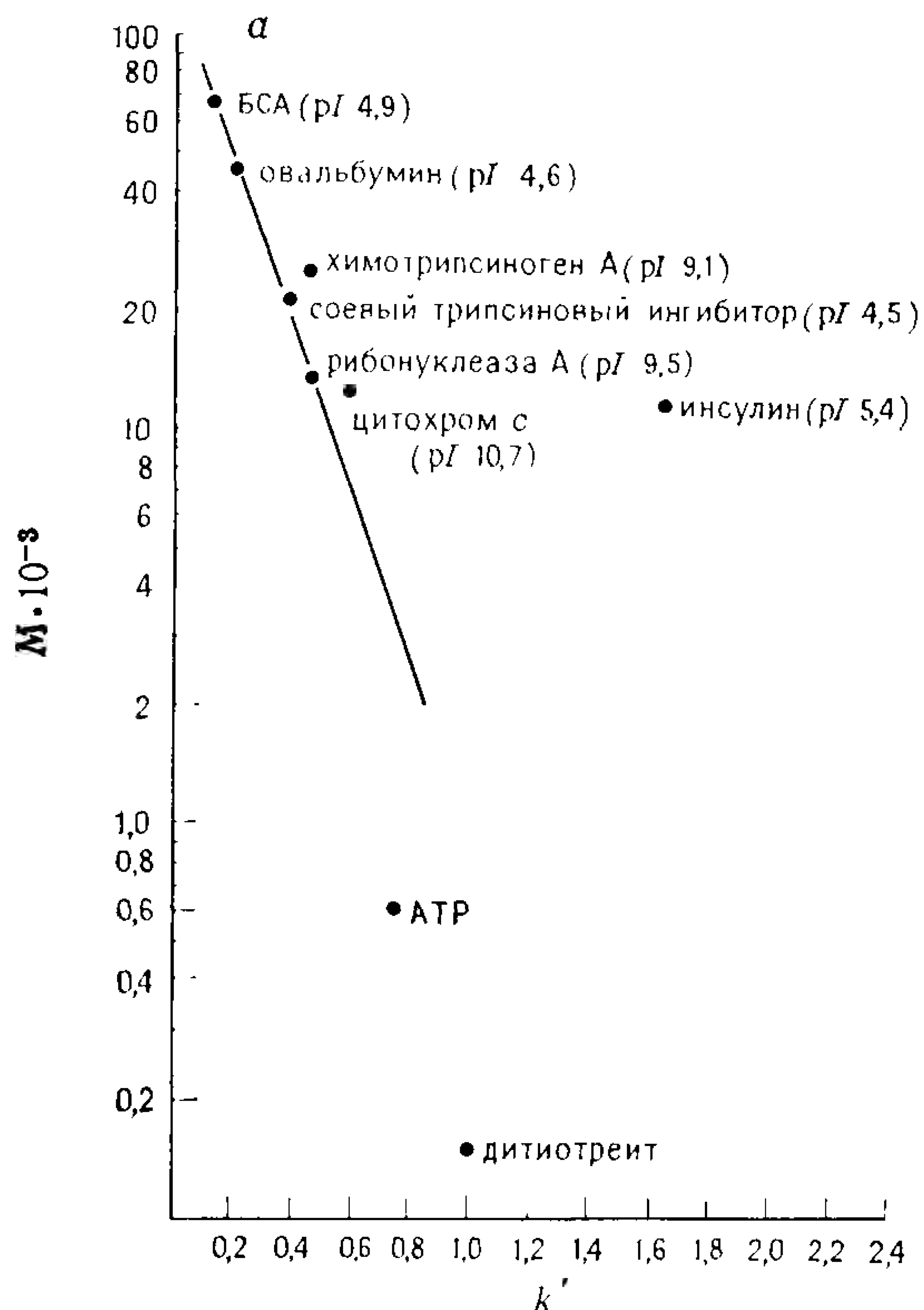


РИС. 6.3. Градуировочные графики, полученные при гель-хроматографии белков на колонках Synchropak TPC 100 (*а*) и 500 (*б*). Элюент — 0,1 М KH_2PO_4 (pH 7); скорость потока 0,5 мл/мин [19].

Зная природу сил физического и химического взаимодействия белков с поверхностью носителя и учитывая факторы, влияющие на кажущиеся величины молекулярных масс *M* белков в растворе, можно определять на колонках (при неденатурирующих условиях) кажущиеся *M* белков с точностью до ~10%. В этих условиях при достаточно высоких выходах белка сохраняется его биологическая активность.

6.2.3. Определение истинных молекулярных масс

Определение *M* белка невозможно до тех пор, пока его молекулы не примут форму беспорядочного клубка. Для этого надо разрушить дисульфидные связи либо путем восстановления или окисления надмуравьиной кислотой, либо проведения сульфитолиза. Хроматографию можно проводить в 0,1%-ном водном растворе ДСН, но лучшие результаты получаются при использовании 6 М гидрохлорида гуанидина (Gu·HCl). Влияние этих детергентов на разделение показано на рис. 6.6 и 6.7 [7—9]. При этом обнаруживается хорошая корреляция между значениями *M* и коэффициентами распределения белков K_D. Детально изучались особенности работы колонок TSKSW 3000 и 4000 (фирмы Toyo Soda) в 6 М Gu·HCl [28]. Полученные при этом данные хорошо совпадали с результатами разделения в агарозных гелях [10]. Обычно не рекомендуется использовать Gu·HCl



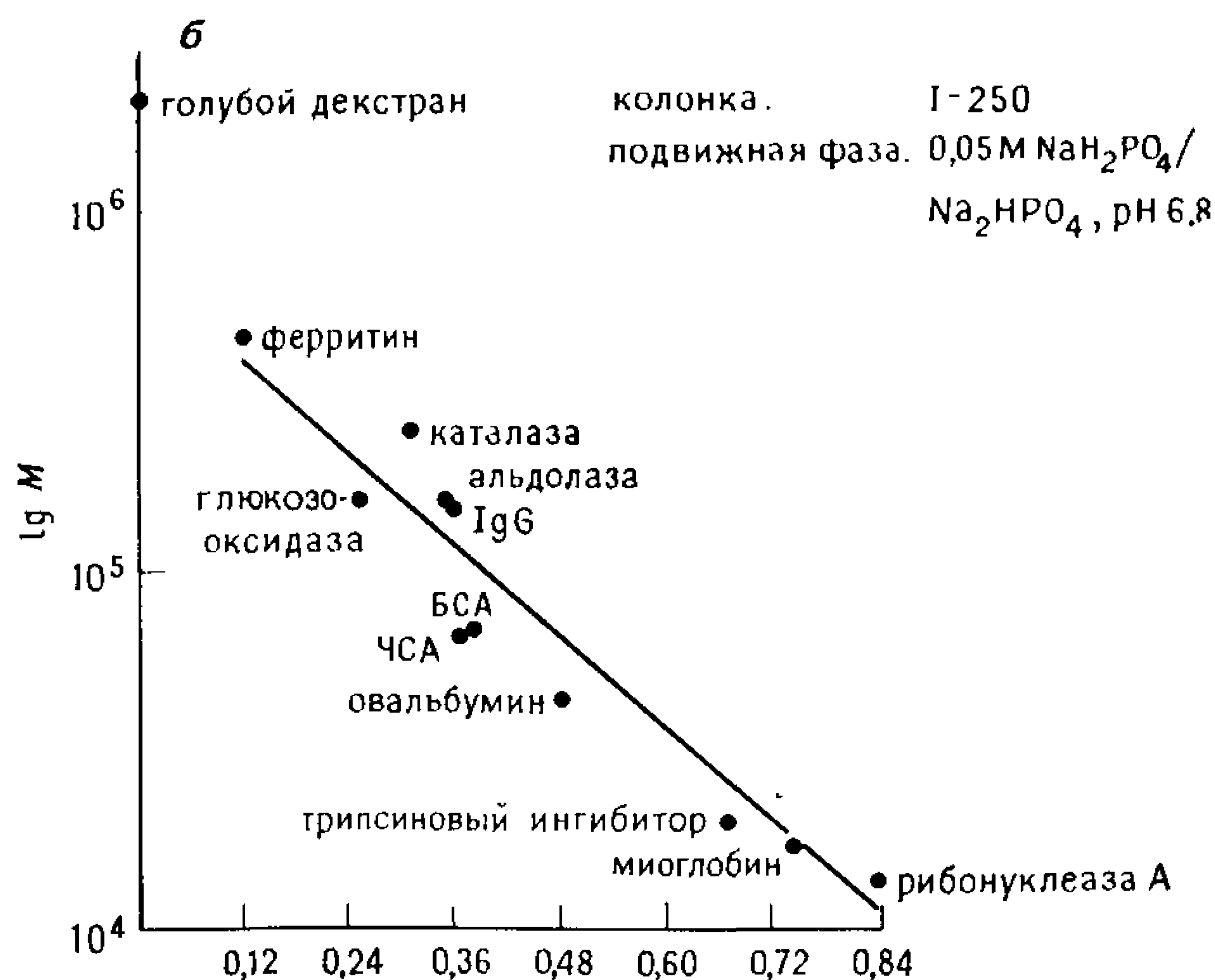


РИС. 6.4. Градуировочные графики гель-хроматографии белков на колонках Waters I-125 (*а*) и I-250 (*б*).
а — две последовательно соединенные колонки Waters I-125; буфер 0,1 М KH_2PO_4, pH 7, скорость потока 2 мл/мин [6]; *б* — буфер — 0,05 М NaH_2PO_4, pH 6,8. (С разрешения фирмы Waters Accociates.)

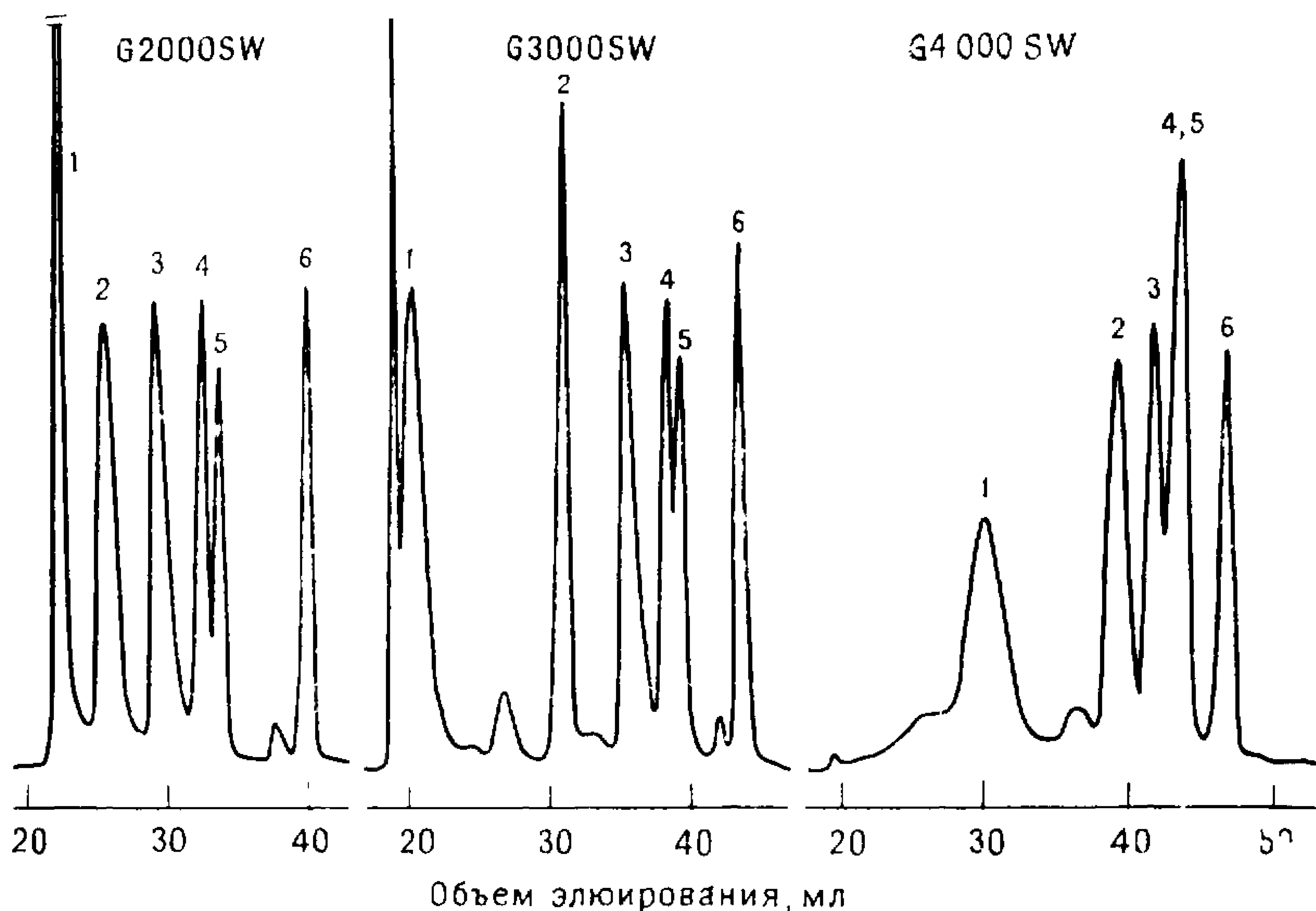


РИС. 6.5. Разделение белков гель-фильтрацией на сорбентах TSK SW с различными размерами пор. Эталонные смеси белков содержали: *1* — тиреоглобулин, *2* — БСА, *3* — β-лактоглобулин, *4* — миоглобин, *5* — цитохром *c*, *6* — тетраглицин [7].

в хроматографах, так как хлорид-ионы вызывают коррозию нержавеющей стали. Однако если по окончании работы тщательно промывать все стальные части, бывшие в контакте с раствором Gu·HCl, то последний можно использовать в работе на хроматографе. Вместо Gu·HCl авторы использовали в качестве подвижной фазы раствор 6 М мочевины, содержащей 0,2 М муравьиную кислоту [31]. Наблюдалось хорошее соответствие между M и K_D, но предел исключения колонки (в данном случае I-125) снизился до M 65 000, что обусловлено разворачиванием полипептидной цепи. Растворы мочевины полезно использовать в структурных исследованиях для подавления взаимодействия белков с носителем, а также в случае плохой растворимости белка. Мочевину удаляют, сорбируя пептиды на патроне Sep-Pak и промывая патрон 0,08%-ной трифтороуксусной кислотой (ТФУ) или 10 мМ·ацетатом аммония. Затем элюируют пептиды 50%-ным водным ацетонитрилом, содержащим 10 мМ ацетат аммония или 0,08%-ную ТФУ. Если пептиды достаточно велики по размеру и не сорбируются на диализных трубках, то мочевину удаляют, используя трубки Spectropor. Большинство образцов хорошо очищается в трубках, задерживающих вещества с M 1000—3500.

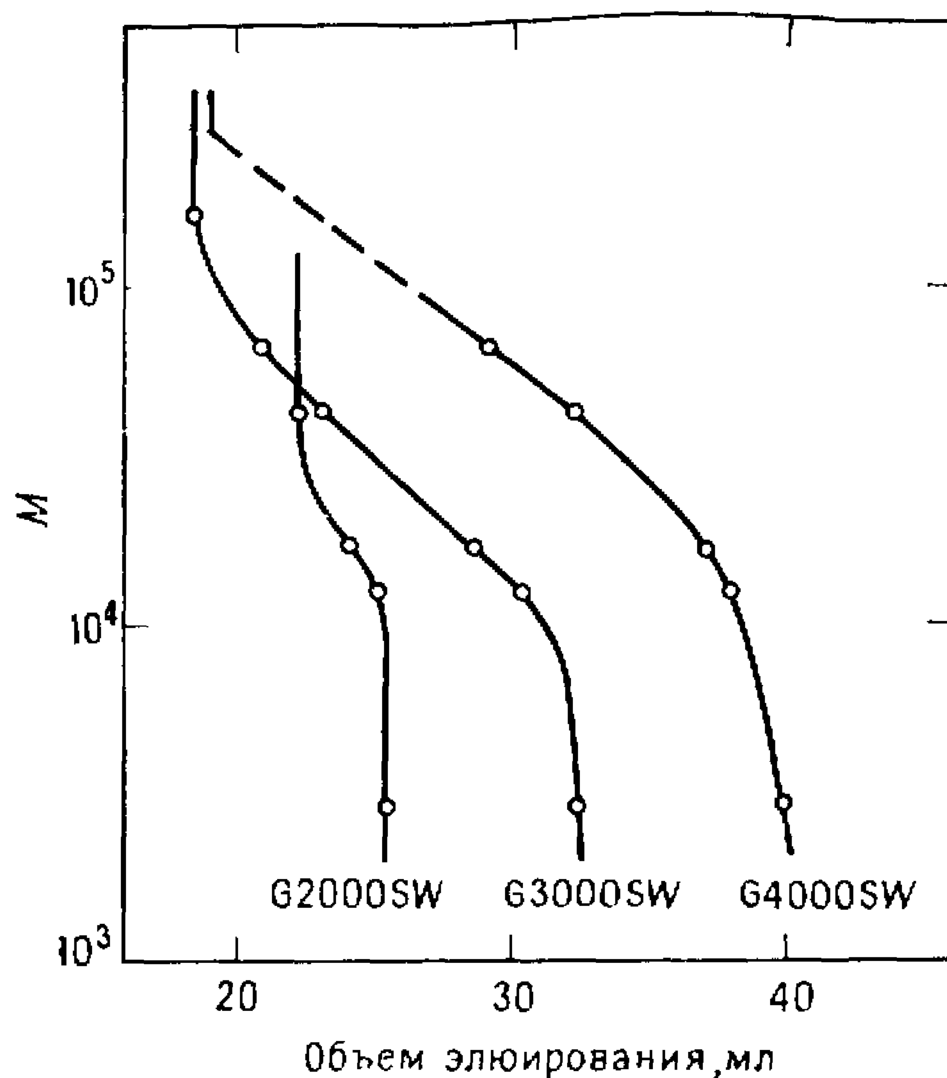


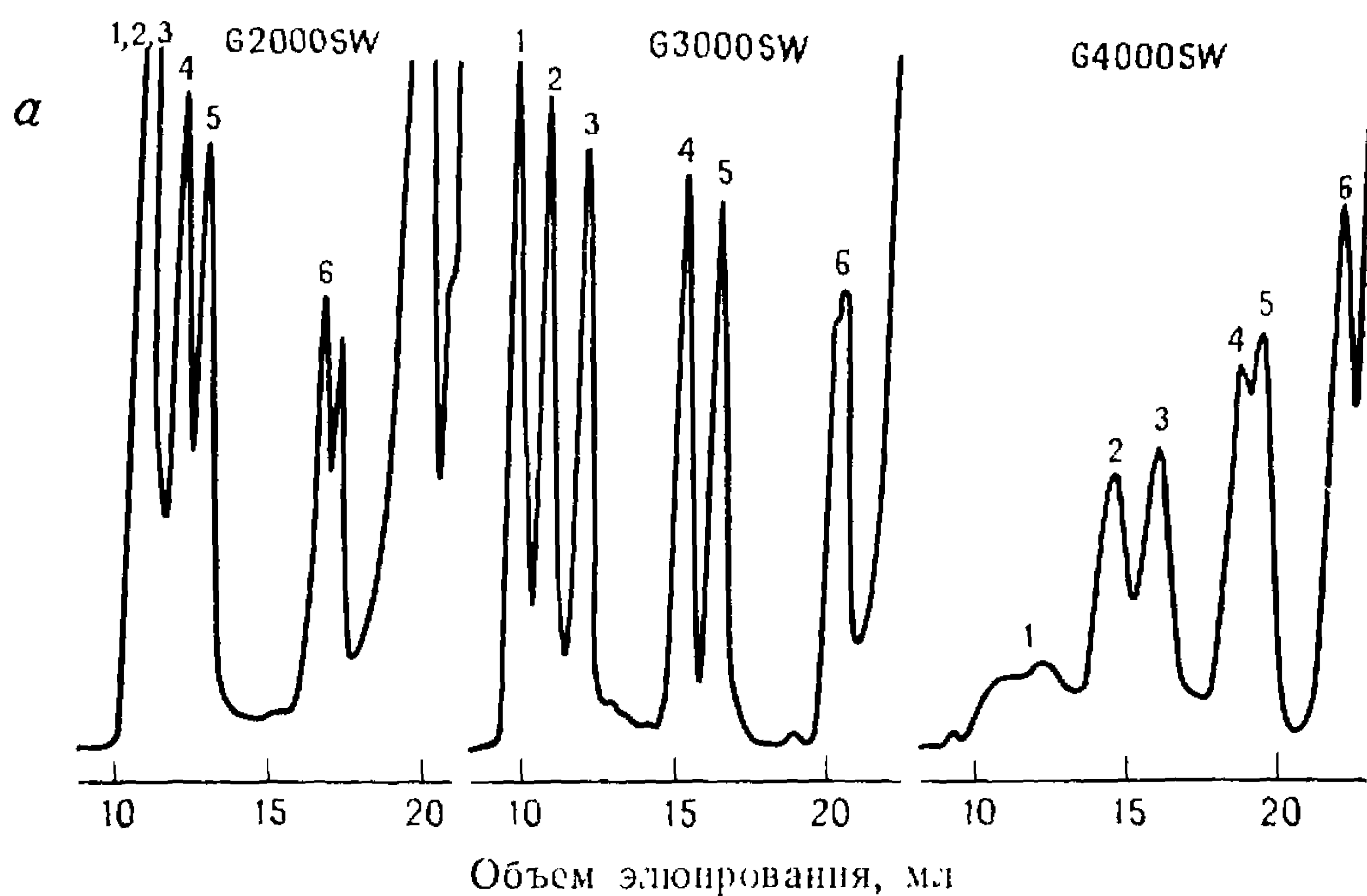
РИС. 6.6. Градуировочные графики разделения белков гель-фильтрацией в растворе ДСН на колонках TSK SW. Буфер 0,1 M NaH_2PO_4, pH 7, содержащий 0,1% ДСН [8].

На колонках, предназначенных для гель-фильтрации, можно работать в режиме распределительной или адсорбционной хроматографии. При этом неполнота модификации носителя используется для сорбции белка. Ниже обсуждается разделение белков рассмотренными методами.

6.3. Адсорбция и распределение полипептидов и белков

Обращенно-фазовая (ОФ) ВЭЖХ пептидов и белков получила широкое распространение с 1976 г. [4, 18]. Попытки перенести методологию разделения малых пептидов в хроматографию больших полипептидов до сих пор чаще всего не приносили большого успеха. При разделении смесей белков или полипептидов на обычных ОФ-сорбентах сталкиваются с проблемами, вытекающими из свойств этих сложных молекул.

Молекулы белков могут иметь на поверхности несколько участков с противоположными свойствами. Эти участки по-разному взаимодействуют с носителями; многие из этих взаимодействий вызывают потерю биологической активности, а необходимость ее сохранения резко ограничивает выбор хроматографических условий. При выделении белка следует избегать взаимо-



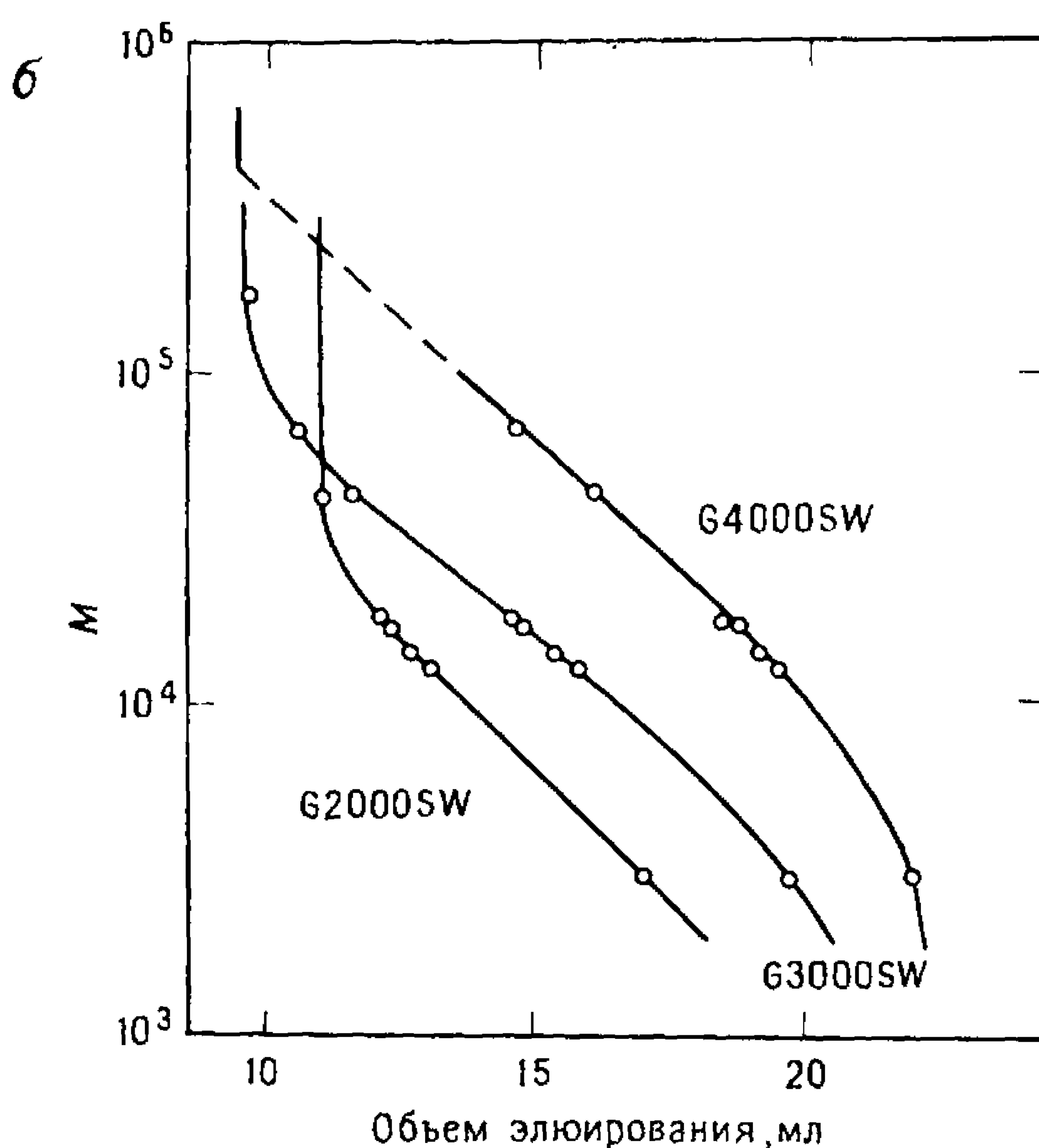


РИС. 6.7. Гель-хроматография белков на колонках TSK SW в растворах Gu·HCl. Белки восстановлены и алкилированы иодоацетамидом [9]. *а* — использованы три колонки TSK SW. Элюент — 6 M Gu·HCl, содержащий 0,1 M NaH_2PO_4, pH 6. Эталонные смеси белков содержали: *1* — тиреоглобулин, *2* — БСА, *3* — овальбумин, *4* — миоглобин, *5* — цитохром *с*, *6* — инсулин; *б* — градуировочные графики для белков, разделенных в 6 M Gu·HCl на колонках TSK SW.

действия компонентов разделяемой смеси с носителем и органическими растворителями; опасны экстремальные pH и резкие изменения концентрации солей. Все эти ограничения не имеют большого значения в тех случаях, когда белок выделяют для изучения его аминокислотной последовательности.

Часто обнаруживается, что белок или полипептид существует в виде нескольких четко различимых форм, которые (часто по непонятным причинам) разделяются при помощи ОФ-ВЭЖХ. Такие неожиданности, конечно, осложняют фракционирование. Поскольку хроматография даже в наши дни все еще остается экспериментаторским искусством, то остается только посоветовать тщательно подбирать условия очистки образца, позволяющие получить материал в гомогенном состоянии.

Обзор текущей литературы дает ключ к выбору исходной стратегии разделения, способной принести успех. Почти всегда приходится опробовать разные режимы разделения методом проб и ошибок, и, конечно, для этой работы потребуется довольно много изучаемого материала. Во многих случаях гораздо выгоднее сначала использовать быструю жидкостную хроматографию белков, а не ОФ-ВЭЖХ. Ниже приводится краткое описание методов, которые, возможно, привлекут к себе внимание биохимиков.

Существует несколько систематических и оригинальных подходов к проблемам разделения больших полипептидов и белков. Изучалось хроматографическое поведение больших пептидов в системах, содержащих триалкиламмоний- и тетраэтиламмонийфосфаты и формиаты [21]. Докладывалось об изучении поведения 32 полипептидов [13, 15]; в ходе этой работы удалось разделить с высоким разрешением такие белки, как миоглобин, цитохром *c*, лизоцим, используя 0,1 М фосфат (pH 2,1, суммарное содержание электролитов 0,2 моль/л) и градиент концентрации ацетонитрила. Для оптимального разделения оказалось необходимым использовать и солевые эффекты, и низкие pH; большую роль сыграла концентрация органического растворителя. В кислых буферах (pH $\sim$2) боковые цепи Asp и Glu остаются незаряженными, что увеличивает гидрофобность полипептида. Добавление солей приводит к подавлению ионных взаимодействий с носителем. Ацетонитрил как органический растворитель и фосфат как солевой фон использованы неслучайно; это дает возможность регистрировать в элюате пептиды по поглощению пептидной связи при 215 нм.

Недостатком такой системы является необходимость последующего обессоливания образцов, предназначенных для структурных исследований. Сообщалось об использовании кислых буферов, содержащих добавки солей, для очистки полипептидных гормонов, а также о применении мини-колонок для концентри-

рования образцов [14]. Большие пептиды ($M \leqslant 10\,000$) фракционировали в буфере на основе ТФУ, а при разделении бромоциановых фрагментов коллагена (M 3000—60 800) использовали буфер, содержащий гептафторомасляную кислоту (ГФМК) [1]. Для подготовки образца к разделению его концентрируют путем адсорбции в верхней части колонки Vydac C18 [30], причем ГФМК предпочтительнее, чем ТФУ и фосфорная кислоты; показано также преимущество широкопористых носителей (поры 30 нм) перед сорбентами с малым размером пор (6—10 нм). Большой размер пор позволяет молекулам с большой молекулярной массой проникать внутрь частиц сорбента.

В качестве примера оптимизации условий ВЭЖХ больших фрагментов белков можно привести разделение бромоциановых пептидов фетального гемоглобина человека. В ходе исследования изучалось влияние формы частиц носителя, размера пор, природы неподвижной фазы на эффективность разделения [16]. Было показано, что применение буферов на основе ТФУ и *н*-пропанола в случае сорбентов с размерами пор 30 или 100 нм увеличивает выход пептидов в 1,7—2 раза по сравнению с выходами, полученными для сорбентов с порами 10 нм [16]. Высказано предположение, что на результаты разделения влияет и геометрическая форма частиц сорбента, так как для разных сорбентов одной фирмы (Lichrosphere и Lichrosorb), имеющих поры одного размера (10 нм), получены разные выходы больших пептидов.

К сожалению, испытания по указанным параметрам проводили для очень узкого набора колонок, что затрудняет интерпретацию результатов исследования. Можно предположить, что увеличение размера пор облегчает доступ молекул полипептида во внутренние каналы частиц, и, по-видимому, это подтверждается в работах, посвященных данному вопросу. По мере накопления экспериментальных данных складывается впечатление, что главным фактором, влияющим на ВЭЖХ полипептидов на широкопористых носителях, является площадь доступной поверхности, а не размер пор частиц. При уменьшении размера колонки до 50 мм сохраняется ее разрешающая способность, что свидетельствует об участии адсорбции в процессе разделения полипептидов. Опубликована работа по выбору условий ОФ и нормально-фазовой (НФ) ВЭЖХ применительно к полипептидам и белкам [23]. Для очистки β-липотропина [24], β-эндорфина [25] использовали Lichrosorb RP-18, а для очистки лейкоцитарного интерферона — Lichrosorb RP-8 в сочетании с Lichrosorb DIOL [23]. Средний размер пор двух последних сорбентов составляет 10 нм. В качестве органического модификатора был выбран *н*-пропанол.

В некоторых работах (включая очистку интерферона) при-

меняли двухстадийное фракционирование в разных буферах (pH 4 и 7,5). Ионные взаимодействия, выявленные в случае носителя RP-8, подавляли формиатом пиридиния или ацетатом аммония. Так как при использовании этих буферов невозможно регистрировать изменение поглощения элюата при 215 нм, то применяли автоматизированные послеколоночные методы флуоресцентного детектирования [2]. Результаты разделения на RP-8 приведены на рис. 6.8. Образец наносили на колонку RP-8 (4,6×250 мм, размер зерна сорбента 10 мкм) в 62,5 мл 4 *М* раствора мочевины, содержащего 0,1 *М* ацетат натрия (pH 7,5). Колонку промывали 1 *М* ацетатом натрия (pH 7,5). Пептиды элюировали в градиенте концентрации *н*-пропанола (1 ч, 0—20%; 3 ч, 20—40%) при скорости потока 0,25 мл/мин. Элюат контролировали на присутствие интерферона, нужные фракции объединяли (рис. 6.8, *а*).

Таким образом, нанося на колонку образец в большом объеме буфера, содержащего мочевину и ацетат, можно значительно ускорить процесс концентрирования и разделения образцов благодаря адсорбции полипептидов на ОФ-сорбентах. Пептиды отделяют от мочевины на патронах Sep-Pak [31] или на миниколонках [14]; Sep-Pak использовали и для концентрирования образца перед ВЭЖХ [1].

Иногда ОФ-колонки применяют для проведения нормально-фазовой (НФ) хроматографии [23]. При последующем элюировании в ОФ-режиме с колонки RP-8 выделены фракции, содержащие интерферон. К объединенным фракциям добавляли *н*-пропанол (до концентрации 80%), раствор наносили на колонку Lichrosorb DIOL. Понижая концентрацию *н*-пропанола во время разделения, получили очищенный интерферон (рис. 6.8, *б*). Для полной очистки образца его пропустили еще через две ОФ-колонки (рис. 6.8, *в* и *г*). НФ-хроматография особенно полезна при очистке гидрофобных белков, растворимых в системах с высоким содержанием органических растворителей. В таких системах вместе с гидрофобными белками могут соосаждаться многие другие белки, однако последние можно отделить ОФ-хроматографией, что позволяет получить гидрофобные объекты в растворенном состоянии [23]. Ранее уже обсуждалось применение сорбента Lichrosorb DIOL для гель-фильтрации полипептидов (разд. 6.2.2). Недавно фирмы LKB и Toyo Soda предложили использовать фенил-TSK-колонку для НФ-хроматографии пептидов.

Проводились сравнительные испытания сорбента Lichrosphere (размер пор 50 нм) с носителями, покрытыми фазой C_8, имеющими поры 10 нм. Сравнение показало, что в случае носителей, имеющих большие поры, емкость колонки по большим белкам (бычий сывороточный альбумин, коллаген) увеличивается, а ши-

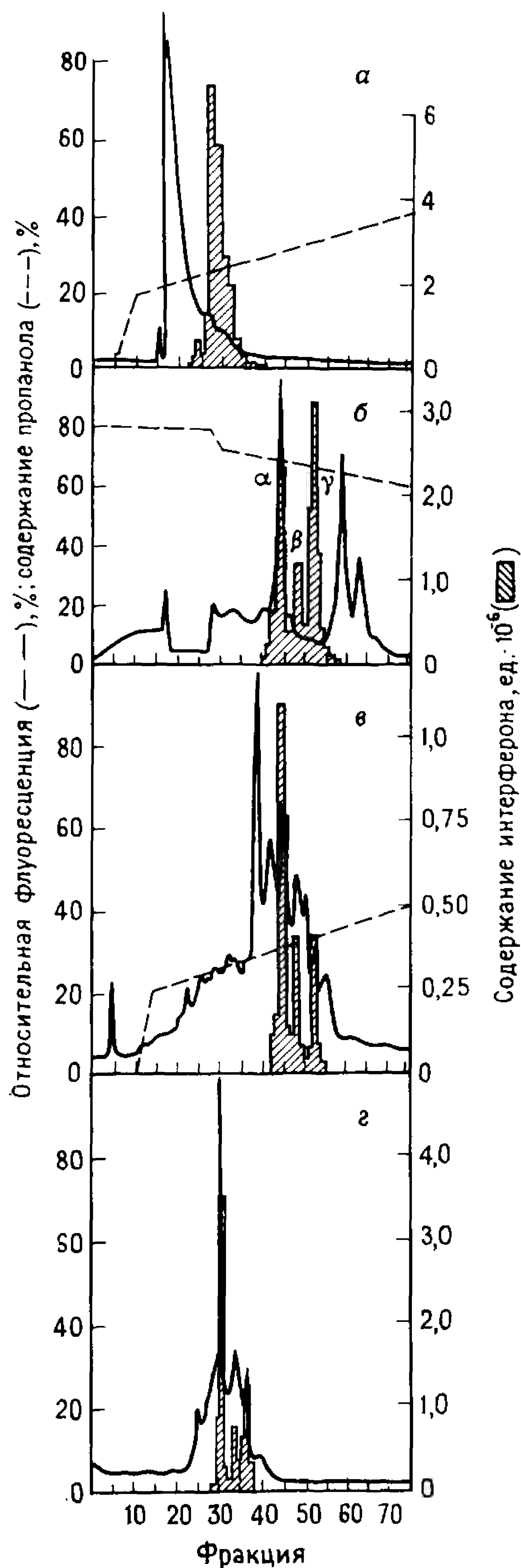


РИС. 6.8. Очистка интерферона на Lichrosorb RP-8 с использованием ОФ- и НФ-ВЭЖХ. *а* — на колонку нанесли 63 мл раствора интерферона в 4 М мочевина — 0,1 М ацетат натрия: колонка промыта 1 М ацетатом натрия, pH 7,5; белок элюировали в градиенте *н*-пропанола (см. текст); *б* — фракции элюата, содержащие интерферон из *а*, объединяли и доводили содержание *н*-пропанола до 80%; наносили на колонку, элюировали в 0,1 М ацетате натрия с градиентом концентрации *н*-пропанола (72,5 — 50%); скорость потока 0,25 мл/мин [26]; *в* — фракции из НФ-разделения, содержащие интерферон, объединяли и разделяли ОФ-ВЭЖХ в пиридинформиатных буферах в градиенте концентрации *н*-пропанола; *г* — хроматография продукта, полученного из разделения *в*. Условия разделения аналогичны *в*.

Замечание. Измерения флуоресценции проводили в элюате с постколоночной обработкой фракций.

рина зоны элюирования уменьшается. На сорбентах с порами 10 нм можно проводить разделение белков с *М* 10 000—20 000.

6.3.1. Подготовка к нанесению образца

ОФ-носители используют для предварительной очистки и концентрирования полипептидов. Описано применение мини-колонок, заполненных Partisil-10 ODS (10 мкм, размер пор 5,5—6,0 нм, фирма Whatman, Англия), для крупномасштабного фракционирования клеточных экстрактов и культуральных сред [14]. Использование растворов с кислыми pH помогает инактивировать протеазы. Разделения проводят в растворах, содержащих хлорид натрия и ацетонитрил. Например, клеточные экстракты хроматографировали на патронах Sep-Pak (носитель, силикагель, модифицированный октадецилхлоросиланом) в растворе 5%-ной (об./об.) муравьиной кислоты, содержащей 1% (масс./об.) хлорида натрия и 1% (об./об.) ТФУ [1]. Ткани делипидировали обработкой ацетоном при —20 °С, экстрагировали гексаном, ацетоном, сушили. После нанесения образца на колонку патрон промывали 0,1%-ной ТФУ; компоненты смеси элюировали 80%-ным ацетонитрилом, содержащим 0,1% ТФУ. Элюат разбавляли 0,1% ТФУ в соотношении 1 : 4 и наносили на аналитическую колонку.

При выделении интерферона 60 мл раствора частично очищенного белка, полученного после фракционирования на сефадексе G-100 в 4 М мочевине, наносили на ОФ-колонку [26]. Патроны Sep-Pak применяли для отделения пептидов от мочевины после гель-фильтрации в растворах муравьиной кислоты [31]. Элюирование проводили в ацетате, содержащем ацетонитрил.

Таким образом, используя специфическую сорбцию пептидов и белков, на ОФ-колонки можно наносить большие объемы экстрактов биологического материала. Правильный выбор природы и содержания органического растворителя помогает увеличить селективность разделения [23].

Условия нанесения образца на ОФ-колонку существенно влияют на результаты фракционирования. При выделении пептидов для структурных исследований практикуется нанесение образцов в растворах, содержащих мочевину или Gu·HCl. Это помогает растворить образцы, предотвращает агрегацию молекул, способствует адсорбции образца на носителе. Адсорбция образца, позволяющая нанести вещество ровным слоем и создать оптимальные условия для взаимодействий между подвижной фазой и растворенным веществом, является одним из важнейших условий успешного фракционирования полипептидов. При больших объемах наносимого образца повышается эффективность последующих хроматографических разделений.

6.3.2. Выбор колонки для обращенно-фазового разделения

Колонки, заполненные сорбентом с диаметром частиц 5—10 мкм, имеющих поры 10 нм, пригодны для разделения очень многих пептидов, но для выделения полипептидов большой молекулярной массы (≥20 000) целесообразнее использовать сорбенты с диаметром пор ≥50 нм. Применение кислых буферов с высоким содержанием солей предотвращает взаимодействие полипептидов с немодифицированными силанольными группами. Некоторые колонки (Ultrapore RPSC, фирмы Altex, Vidac, Zorbax C_8, Bioseries фирмы Dupont) имеют высокую степень дополнительной модификации, проводимой для удаления остаточных силанольных групп, что делает эти колонки предпочтительными для выделения пептидов. В настоящее время наиболее эффективны сорбенты, покрытые углеводородами C_3, C_4, C_8. На колонке Ultrapore RPSC (C3) удается добиться особенно хорошего разделения (рис. 6.9).

6.3.3. Подвижная фаза

Обычно разделения проводят в кислых буферах (pH ~2), содержащих 0,1%-ную ТФУ или 0,1 М растворы фосфата или ацетата. Слабокислые (pH 4) и нейтральные (pH 7) буферы оказались удобными для последующего более тонкого фракционирования [23]. Из органических растворителей чаще всего применяют ацетонитрил и пропанол.

Для предварительной оценки условий разделения можно использовать одну из следующих систем:

1) 0,1 М NaH_2PO_4—H_3PO_4 (pH 2,1, общее содержание фосфата 0,2 моль/л), градиент концентрации ацетонитрила 10—40% [14];

2) 1 М пиридин — 2 М муравьиная кислота (pH 4,0), линейный градиент концентрации *н*-пропанола 20—40% + 1 М ацетат натрия (pH 7,5) или линейный градиент концентрации *н*-пропанола 0—40% [23];

3) 0,1%-ная ТФУ или ГФМК с градиентом концентрации ацетонитрила 0—40% [1] (рис. 6.9). Использование этого раствора позволяет детектировать поглощение элюата при 206—215 нм; препараты, содержащиеся в элюате, легко лиофилизировать.

6.4. Обращенно-фазовое разделение пептидов

Впервые ОФ-ВЭЖХ была использована для разделения смесей пептидов в 1976 г. сразу в нескольких лабораториях независимо друг от друга. С тех пор опубликовано очень много сообще-

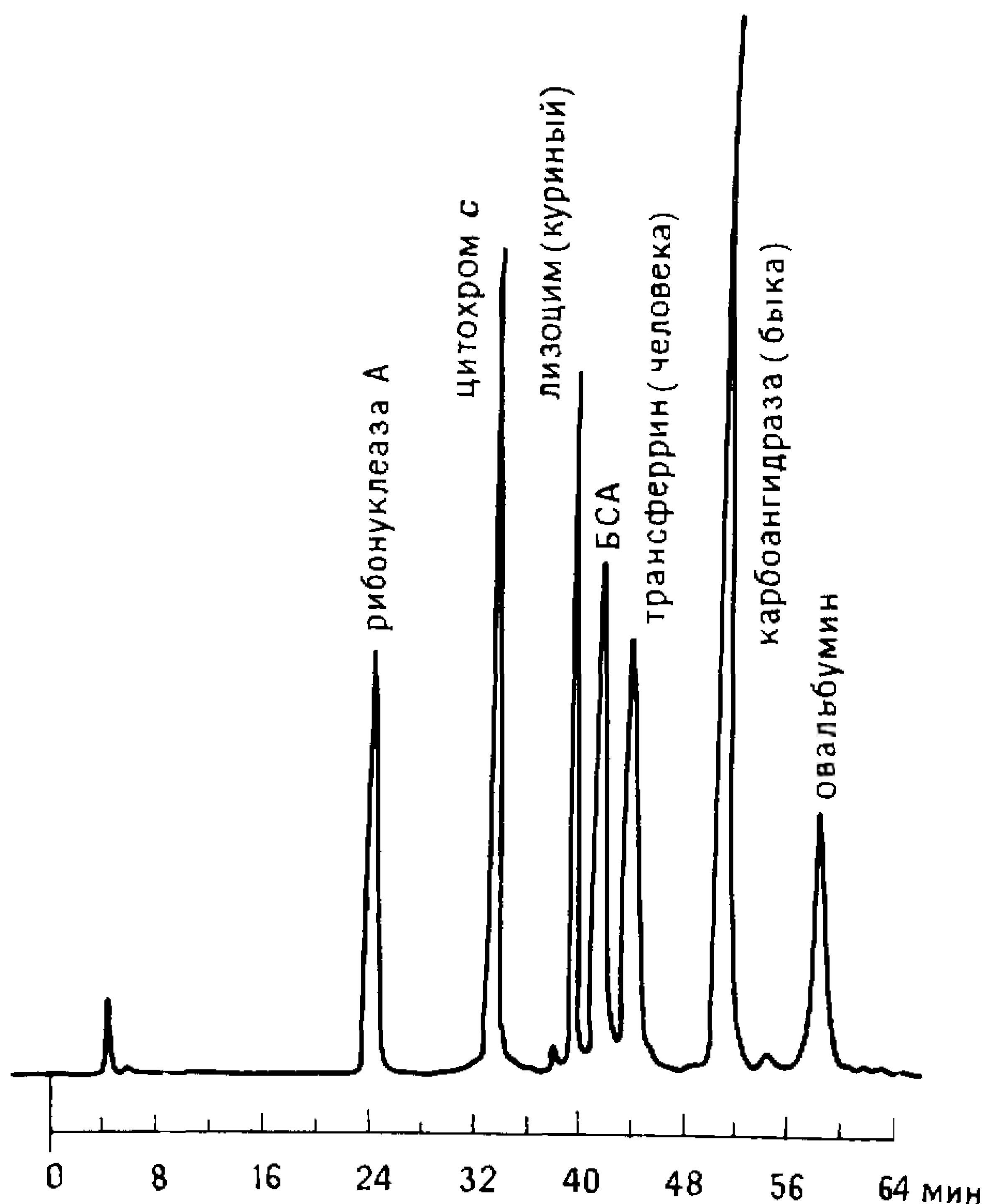


РИС. 6.9. Разделение нативных белков (~20 мкг каждого) при помощи ОФ-ВЭЖХ с использованием широкопористых сорбентов с короткими алкильными цепями. Белки фракционировали в 0,01 М ТФУ с градиентом концентрации ацетонитрила (20—70%) при скорости потока 0,2 мл/мин. Использована колонка Ultrapore RPSC (4,6×75 мм). Определение по оптической плотности при 280 нм.

ний об использовании самых разных носителей и подвижных фаз для разработки методик быстрого высокоэффективного разделения биологически активных пептидов или фрагментов белков. Поскольку многие однотипные сорбенты обладали незначительными различиями в разделяющей способности, в литературе появилось множество сходных между собой методик.

На процесс разделения пептидов влияют: природа органического растворителя, содержание воды, ионная сила, pH, температура, способность системы к ион-парным и ионообменным взаимодействиям.

6.4.1. Выбор состава подвижной фазы

Состав подвижной фазы должен отвечать требованиям, предъявляемым к условиям выделения и состоянию очищенного препарата.

1. Следует учитывать спектральные свойства элюента. Пептидная связь поглощает при 206—215 нм, поэтому можно количественно оценивать элюирование всех пептидов. При выборе состава подвижной фазы обязательно следует учитывать это обстоятельство. Органические кислоты довольно прозрачны при 206—215 нм, хотя при их высокой концентрации наблюдается подъем уровня базовой линии из-за поглощения света этими соединениями. Конкретный растворитель можно выбрать, пользуясь справочными таблицами, опубликованными в проспектах фирм или в учебниках. Чаще всего применяют ацетонитрил, метанол, *н*-пропанол, этанол. Чистота растворителя влияет на смещение базовой линии, происходящее при градиентном элюировании. Выпускаются растворители, позволяющие работать при длине волны 200—215 нм.

2. Необходимо принимать во внимание размер, заряд, гидрофобность пептидов. До последнего времени разделение больших пептидов (содержащих более 30—40 остатков) проводили по размеру молекул. На ОФ-носителях пептиды разделяются благодаря гидрофобным взаимодействиям, поэтому увеличение гидрофобности пептидов вызывает увеличение времени удерживания. Поскольку диапазон pH ограничен областью 2,0—7,5 (из-за неустойчивости носителя к гидролизу), то изменение pH буфера влияет в основном на карбоксильные и α-аминогруппы пептидов. Поэтому при $pH<pI$ боковых цепей Asp и Glu возрастет гидрофобность пептида, так как карбоксилы боковых цепей будут в основном незаряженными. Гидрофобность пептидов можно изменять, используя ионно-парные взаимодействия заряженных боковых цепей. Например, при pH 4 соли аммония образуют ионную пару, что позволяет подавить ионные взаимодействия карбоксильных групп. Ионно-парные взаимодействия с анионами или катионами боковых цепей используют как для повышения, так и для понижения полярности пептидов. Время удерживания на колонке пептида, вступившего в ионно-парное взаимодействие, зависит от способности комплекса к участию в распределительной хроматографии или от адсорбции ионно-парного реагента неподвижной гидрофобной фазой, что приводит к ионообменным взаимодействиям.

Для большинства разделений бывает достаточно использовать фазы, содержащие ТФУ, фосфорную кислоту или ацетат аммония. В особых случаях (например, разделение смесей пептидов, имеющих повышенное содержание кислых групп) используют более сложные ионно-парные системы [4].

3. Если необходимо отделить пептид от всех сопутствующих компонентов раствора, то вместо обессоливания, сопровождающегося большими потерями образца, следует проводить лиофилизацию. При этом обычно отдают предпочтение легко удаляе-

мым в вакууме ацетату и бикарбонату аммония, формиату триэтиламмония, ТФУ, ГФМК, муравьиной и уксусной кислотам.

4. Условия выделения образца не должны мешать последующему определению его свойств. Для проведения многих видов биоиспытаний необходимо удалить органические растворители. Обычно это делают испарением в токе азота. Следует следить за тем, чтобы присутствующие соли и pH раствора не влияли на проведение испытаний.

6.4.2. Выделение пептидов с использованием фосфорной кислоты

Для контроля хода ферментативного расщепления кальцитонинсвязывающего белка использовали ВЭЖХ [15]. Гидролизат наносили на колонку без предварительной обработки. Фракционирование пептидов проводили в 0,1%-ной фосфорной кислоте (pH 2,2) в градиенте концентрации ацетонитрила. В ходе препаративного выделения пептидов регистрировали оптическое поглощение элюата при 210, 254, 280 нм. Фосфорная кислота, остающаяся после лиофилизации фракций, не мешала проведению аминокислотного анализа, определению N-концевых аминокислот при помощи данснлхлорида, автоматическому определению аминокислотной последовательности. Ферментативный гидролизат разделяли без предварительной обработки.

6.4.3. Разделение пептидов с использованием трифтороуксусной и гептафторомасляной кислот

ТФУ и ГФМК используются в анализе аминокислотной последовательности по Эдману и доступны в высокоочищенном состоянии. Буферы на основе этих кислот летучи и прозрачны при 215 нм. Описано применение ТФУ и ГФМК для разделения пептидов [1, 30]. Эти кислоты идеальны как растворители для выделения пептидов; типичным примером служит фракционирование триптического гидролизата цитохрома *с* на колонке с сорбентом Vydac C18 в градиенте концентрации ацетонитрила (рис. 6.10).

6.4.4. Корреляция между удерживанием и структурой

Существует определенная взаимозависимость между гидрофобностью пептидов и их удерживанием на ОФ-носителе. По результатам хроматографии ряда пептидов рассчитывались их коэффициенты гидрофобности с учетом коэффициентов распределения пептидов в системе октанол — вода [15]. Обнаружена зависимость между суммой коэффициентов гидрофобностей отдельных аминокислот и временем удерживания пептидов. Однако следует отметить, что в опубликованных данных имеются значительные противоречия.

Для снижения влияния конформационных эффектов и улучшения формы пика использовали хаотропный агент (0,1 М перхлорат натрия с добавкой 5 мМ фосфата натрия или 0,1% фосфорной кислоты для получения раствора с pH 7,4 или 2,1) и

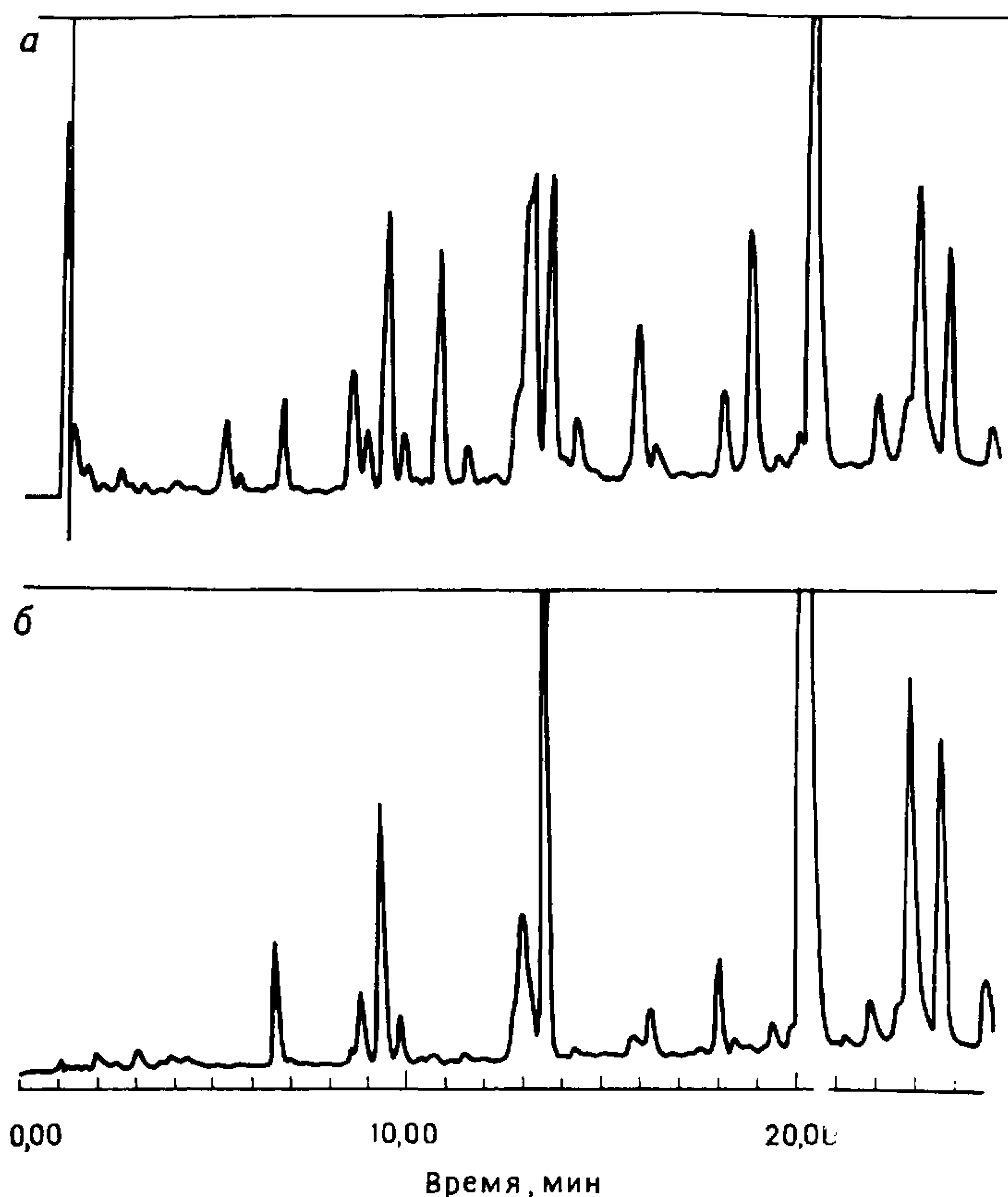


РИС. 6.10. Разделение триптических пептидов цитохрома *с* ОФ-ВЭЖХ. Гидролизат фракционировали на колонке Vydac RP (C18) (4,6×75 мм) в 0,08%-ной ТФУ с градиентом концентрации ацетонитрила 1—40%. Поглощение элюата записывали при помощи детектора с диодной линейкой (Hewlett Packard 1040). *а* и *б* — определение оптического поглощения при 215 (*а*) 280 нм (*б*); *в* — результаты сканирования фракций, не содержащих ароматических аминокислот (*1*), содержащих Tyr (*2*), Trp (*3*) и гем (*4*). По результатам сканирования отбирали отдельные пептиды для последующего анализа.

градиент концентрации ацетонитрила [12]. При этом получено хорошее соответствие между изменением коэффициентов удерживания и временем элюирования выделяемых пептидов. Проводилось детальное исследование теории равновесного распределения [5, 11]; в ходе этой работы показана возможность разумного предсказания последовательности элюирования пептидов с использованием суммы коэффициентов гидрофобности боковых цепей аминокислот. Многочисленные убедительные примеры использования ОФ-ВЭЖХ для препаративного и аналитического

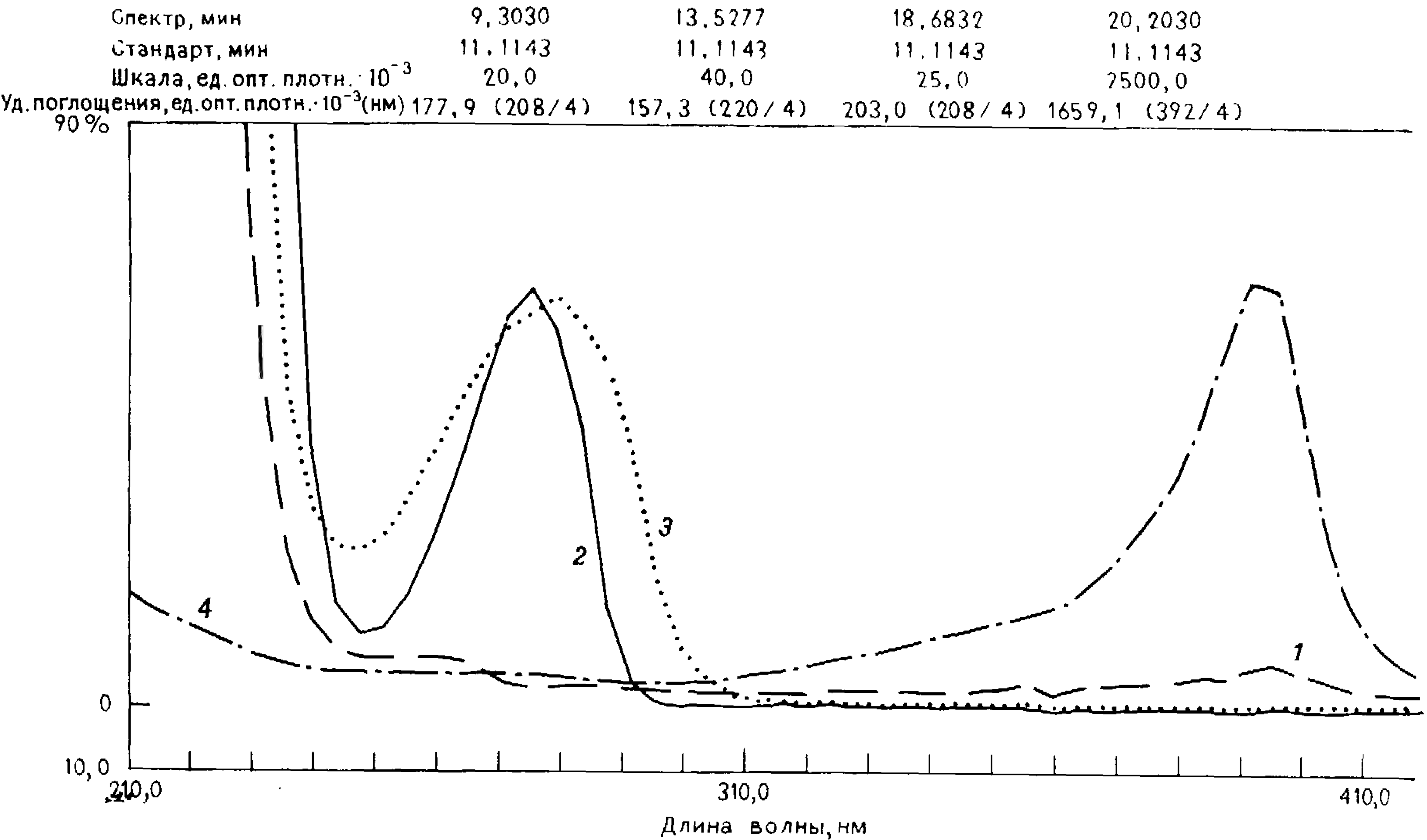

Спектр, мин 9,3030 13.5277 18.6832 20,2030
Стандарт, мин 11,1143 11,1143 11,1143 11,1143
Шкала, ед. опт. плотн. · 10^-3 20,0 40,0 25,0 2500,0
Уд. поглощения, ед. опт. плотн. · 10^-3 (нм) 177,9 (208/4) 157,3 (220/4) 203,0 (208/4) 1659,1 (392/4)
90%
0
10,0
210,0
310,0
410,0
Длина волны, нм
1
2
3
4

РИС. 6.10. в

фракционирования пептидов показали несомненную ценность этого метода.

Особенно привлекательно для анализа пептидов использование многоволнового детектирования для оценки чистоты или селективного выделения отдельных пептидов. В настоящее время несколько фирм производят оптические сканнеры, снабженные компьютерами, записывающими базовую линию, наклон и уровень сигнала при сканировании пика (рис. 6.10). В некоторых случаях полезно использовать отношения поглощения на разных длинах волн.

6.5. Скоростная жидкостная хроматография белков

Скоростная жидкостная хроматография белков (СЖХБ) получила широкое применение при исследовании биополимеров; рассмотрим основные достоинства этого метода [20].

Фирма Pharmacia разработала колонку с частицами размером 9,8 ($\pm 2\%$) мкм, устойчивыми в области $2<pH<12$. Сорбент доступен в форме катионита и анионита, а также в виде носителя с поверхностью, модифицированной для проведения хроматофокусирования (колонки Mono Q, Mono S и Mono P). Эти сорбенты обладают высокой емкостью, позволяют работать при больших скоростях потока (до 1 мл/мин), при умеренных давлениях (10—20 бар), создаваемых плунжерными насосами. Благодаря низким давлениям можно использовать стеклянные колонки. Химическая устойчивость носителей дает возможность применять широкий набор буферов, включая детергенты, хаотропные агенты (например, Gu·HCl). Фирма Pharmacia разработала ряд буферов, с помощью которых можно добиться оптимального разделения в определенных диапазонах pH, без изменений pH, присущих обычной ионообменной хроматографии. Время разделения чрезвычайно мало (1—5 мин), потому что степень разделения зависит от времени разделения значительно меньше, чем в других ионообменных процессах. Данные о элюировании белков, полученные на обычных ионообменниках, можно переносить на эксперименты СЖХБ, и обычно это приводит к улучшению разделения. При отсутствии информации о свойствах белковой смеси, подлежащей фракционированию, проводят оптимизацию условий разделения, ставя несколько экспериментов по СЖХБ с использованием разных буферов; результаты этих экспериментов представляют в виде кривых элюирования. В периодических изданиях фирмы Pharmacia описаны широкие возможности потенциального применения колонок этой фирмы, предназначенных для СЖХБ. Принципиально возможно (но не рекомендуется самой фирмой) использовать эти колонки на обычных хроматографах, снабженных соответствующими со-

единениями и клапанами сброса давления, превышающего заданную величину. Последнее устройство необходимо для защиты стеклянных колонок от разрушения под действием больших давлений.

При работе на таких колонках в присутствии хлорид-ионов при экстремальных pH не следует использовать насосы, изготовленные из нержавеющей стали.

Хроматофокусирование с применением колонок Mono Q — это новый метод, который характеризуется высоким разрешением; он может оказать большое влияние на разработку схем разделения смесей белков. Большим достоинством метода является возможность использовать различия в заряженности белков при pH, близких к p*I* этих же белков. Детальное описание принципиальных основ разделения по этому методу можно найти в литературе фирмы Pharmacia.

6.6. Ионный обмен

Разработка ионообменных носителей, пригодных для ВЭЖХ, началась с работ отдельных исследователей и фирм, главным образом фирмы Pharmacia [17, 18].

В настоящее время известно четыре типа носителей:

1. *Гликофазы* — стеклянные частицы, с пленкой эпоксиполимера на поверхности, ковалентно связанного с силанольными группами стекла глицерилпропильными связями. Поставляются в виде диэтиламиноэтильных, карбоксиметильных и сульфопропильных производных, а также в виде четвертичных аммониевых производных под названием CPG-гликофазы.

2. *Пелликулярные сорбенты* содержат в боковых цепях остатки ДЭАЭ. Поставляются фирмами в виде колонок Synchropak (Synchrom Incorp.).

3. *Ионообменные сорбенты* фирмы Toyo Soda (Япония) представляют собой носители для гель-хроматографии, модифицированные для проведения ионообменных процессов.

4. Носители для СЖХБ (Pharmacia, Швеция).

Эти ионообменники можно использовать для проведения быстрых разделений, по назначению сходных с теми, которые проводятся на обычных мягких гелях. Носители для СЖХБ применяли для разделения сложных смесей [17].

Детально испытывались анионообменные колонки, в частности Synchropak AX-300. При нагрузке 10 мг белка на колонку размером 4,1×250 мм при скорости потока 0,5 мл/мин и градиенте концентрации ацетата натрия (0—0,5 моль/л) в трис-буфере (pH 8) в течение 90 мин выход различных ферментов составлял 90—100% [29].

Несомненно, в ближайшие годы будут продолжаться интенсивные исследования свойств сорбентов такого типа и можно

ожидать, что быстрые ионообменные разделения станут общепринятыми. В настоящее время метод СЖХБ предпочтителен для высокоэффективного ионообменного разделения фракций, полученных при помощи ВЭЖХ.

Литература

1. *Bennett H. P. J., Browne C. A., Solomon S.*, J. Liquid Chromatogr., **3**, 1353—1365 (1980).
2. *Böhlen P., Stein S., Stone J.*, Udenfriend S., Anal. Biochem., **67**, 438—445 (1975).
3. *Fullmer C. S., Wasserman R. H.*, J. Biol. Chem., **254**, 7208—7212 (1979).
4. *Hearn M. T. W.*, Advances in Chromatogr., **20**, 1—82 (1982).
5. *Hearn M. T. W., Grego B.*, J. Chromatogr., **218**, 497—507 (1981).
6. *Jenik R. A., Porter J. W.*, Anal. Biochem., **111**, 184—188 (1981).
7. *Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T.*, J. Chromatogr., **190**, 297—303 (1980).
8. *Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T.*, J. Chromatogr., **193**, 29—36 (1980).
9. *Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T.*, J. Chromatogr., **193**, 458—463 (1980).
10. *Mann K. G., Fish W. W.*, Methods Enzymol., **26**, 28—42 (1972).
11. *Meek J. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **77**, 1632—1636 (1980).
12. *Meek J. L., Rosetti Z. L.*, J. Chromatogr., **211**, 15—28 (1981).
13. *Nice E. C., O'Hare M. J.*, J. Chromatogr., **162**, 401—407 (1979).
14. *Nice E. C., Capp M., O'Hare M. J.*, J. Chromatogr., **185**, 413—427 (1979).
15. *O'Hare M. J., Nice E. C.*, J. Chromatogr., **171**, 209—226 (1979).
16. *Pearson J. D., Mahoney W. C., Hermodson M. A., Regnier F. E.*, J. Chromatogr., **207**, 325—332 (1981).
17. *Regnier F. E.*, Anal. Biochem., **126**, 1—7 (1982).
18. *Regnier F. E.*, Methods Enzymol., **91**, 137—190 (1983).
19. *Regnier F. E., Gooding K. M.*, Anal. Biochem., **103**, 1—25 (1980).
20. *Richey J.*, Technical Review Series, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden (1982).
21. *Rivier J. E.*, J. Liquid Chromatogr., **1**, 343—366 (1978).
22. *Rivier J. E., Spiess J., Perrin M., Vale W.*, In Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography, Hawk G. L. (Ed.), Chromatographic Science Series, vol. 12, Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 223—241 (1979).
23. *Rubinstein M.*, Anal. Biochem., **98**, 1—7 (1979).
24. *Rubinstein M., Stein S., Gerber L. D., Udenfriend S.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 3052—3055 (1977).
25. *Rubinstein M., Stein S., Udenfriend S.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 4969—4972 (1977).
26. *Rubinstein M., Rubinstein S., Familletti P. C., Miller R. S., Waldman A. A., Pestka S.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76**, 640—644 (1979).
27. *Schmidt D. E. Jr., Giese R. W., Conron D., Karger B. L.*, Anal. Chem., **52**, 177—182 (1980).
28. *Ui N.*, Anal. Biochem., **97**, 65—71 (1979).
29. *Vanecek G., Regnier F. E.*, Anal. Biochem., **109**, 345—353 (1980).
30. *Van der Rest M., Bennett H. P. J., Solomon S., Glorieux F. H.*, Biochem. J., **191**, 253—256 (1980).
31. *Waterfield M. D., Scrace G. T.*, In Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography, Hawk G. L. (Ed.), Chromatographic Science Series, vol. 18, Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 135—158 (1981).
32. *Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D.*, In Modern Size-Exclusion Chromatography, Wiley, New York, p. 27 (1979).

Глава 7

ПЕПТИДНОЕ КАРТИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

У. Дж. ГУЛЛИК (W. J. GULLICK, *Protein Chemistry Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, U.K.*)

7.1. Введение

Получение пептидных карт обычно преследует две цели: выяснение структурного сходства молекул белков, выделенных из разных источников, и идентификация изменений в структуре индивидуального белка, возникших в результате нормального или патологического метаболизма. В первом случае это:

1) Сравнение белков с одной и той же функцией, полученных из различных тканей или организмов.

2) Сравнение продуктов трансляции in vitro с эквивалентными им соединениями, выделенными из клеток.

3) Сравнение субъединиц сложных белков.

Изучаемые с помощью картирования индивидуальные белки в свою очередь можно разделить на две группы: белки, превращающиеся в зрелые клеточные формы по посттрансляционным механизмам (ограниченный протеолиз, гликозилирование, присоединение простетических групп), и белки, претерпевающие обратимые структурные изменения (такие, как фосфорилирование или ацетилирование), которые могут влиять на их активность.

Пептидное картирование основано на сравнении физико-химических характеристик отдельных пептидов или их смесей, полученных в результате фрагментации белковой молекулы. Для фрагментации может быть использован любой, приводящий к воспроизводимым результатам метод — расщепление пептидных связей протеолитическими ферментами или химическими реагентами. Эффективность пептидного картирования в каждом конкретном случае определяется выбором оптимальных условий разделения и обнаружения смеси фрагментов и достоверной интерпретацией результатов.

Ниже описываются три общепринятых метода разделения пептидов. Первый из них ПААГ — ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), обычно в одномерном варианте. Разрешение пептидных фрагментов достигается благодаря различиям в их относительных подвижностях, не всегда отражающих истинные молекулярные массы. Очень важно, что электрофореграмму фрагментов одного белка можно сравнивать с электрофореграм-

мой пептидов, полученных из другого белка. Этот метод известен как картирование по Кливленду (по имени первого автора статьи, где он был описан) [12]. В ПААГ в присутствии ДСН могут быть разделены полипептиды с диапазоном молекулярных масс от 10^3 до 10^6, но наиболее достоверные результаты получаются при анализе белков с истинными молекулярными массами от 10^4 до 10^6, поэтому для белков с молекулярной массой $<10^4$ метод обычно не применяется.

Второй метод — двумерное картирование, известное как метод «отпечатков пальцев», (finger printing), он был предложен Ингремом [36, 37] для локализации и последующей идентификации единственного аминокислотного остатка, отличающего полипептидные цепи нормального и серповидноклеточного гемоглобинов. Белок обычно гидролизуют трипсином или α-химотрипсином (Ингрем проводил гидролиз 12 М HCl при 37 °C в течение 2—3 дней), при этом образуется смесь неперекрывающих друг друга коротких (10—20 аминокислот) пептидов. Эта смесь далее разделяется с помощью электрофореза в первом направлении и жидкостной хроматографии — во втором. Пептидные карты — более эффективный способ картирования, чем электрофорез в гелях, поскольку анализируется большое число компонент, образующих определенный набор пятен (рисунок), характерный для каждого индивидуального белка.

В третьем методе, разработанном для картирования пептидов, так же как и в предыдущем, первоначально проводится фрагментация белка на пептиды небольшой молекулярной массы. Далее они разделяются в растворе с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе (ОФ-ВЭЖХ) или на ионообменнике (ИО-ВЭЖХ). В первом случае применяют колонки, упакованные смолой на основе силикагеля с «пришитыми» к нему углеводородными цепями различной длины, во втором носителем служит также силикагель, на поверхности которого расположены способные к ионизации группы. Разделение пептидов происходит вследствие различий во времени их удерживания на колонках. Главные преимущества метода заключаются в высокой скорости процесса (время разделения одного гидролизата может составлять $\leqslant 30$ мин), чувствительности и получении пептидов в форме, удобной для проведения дальнейшего анализа (определение аминокислотного состава и последовательности). Для определения содержания пептидов измеряется оптическая плотность элюата на одной или нескольких длинах волн, а при работе с радиоактивно меченными препаратами регистрируют радиоактивность (в потоке или в дискретных пробах). Для повышения чувствительности обнаружения в пептиды может быть введена флуоресцентная метка.

7.2. Пептидное картирование — типы анализируемых структур

Ниже описаны наиболее вероятные ситуации, с которыми приходится встречаться при сравнительном анализе методом картирования двух белков.

1) Идентичные структуры: аминокислотные последовательности и посттрансляционные модификации (если они есть) полностью гомологичны.

2) Аминокислотные последовательности гомологичны, но имеются различия в модификации боковых цепей или концевых остатков (ацетилирование, гликозилирование, фосфорилирование и т. д.). См. обзор по модификации белков [72].

3) Аминокислотные последовательности одинаковы, но один белок короче другого с N- или C-конца или с обоих концов.

4) Часть последовательности в обоих белках полностью совпадает, но есть полные или частичные различия в другой части.

5) Значительные участки последовательности гомологичны, но по цепи нерегулярно расположены вставки или делеции.

6) Полное несовпадение структур.

Естественно могут быть различные варианты этих основных типов.

Простейшими из всех рассмотренных ситуаций являются первая и последняя, где получаются соответственно полностью идентичные или абсолютно несовпадающие карты. Следует отметить, что сравнительный анализ тем более достоверен, чем больше компонентов содержит исследуемый образец, поскольку он дает больше информации для исследования.

Белки, имеющие гомологичные аминокислотные последовательности, но различающиеся посттрансляционными изменениями (тип 2), дают сходные карты, исключение составляют лишь те фрагменты, подвижность которых изменена вследствие соответствующей модификации. Аналогичная картина (совпадение части хроматограммы) наблюдается и в ситуации 4. Обнаружить любые различия в структуре с помощью одномерного электрофореза в гелях, где анализируются крупные полипептиды менее вероятно, чем с помощью пептидных карт, поскольку при небольшой молекулярной массе изменения гидрофобности или заряда сказываются на поведении пептида в значительно большей степени.

Если один из двух белков является частью другого (тип 3), то пептидная карта укороченного образца будет отличаться отсутствием лишь одного или нескольких фрагментов. Кроме того, один фрагмент в каждой из карт не будет общим, а именно тот, который примыкает к точке расщепления или образуется в результате него. В случае если белок укорочен по сравнению с

другим как с N-, так и с С-конца, таких несовпадающих фрагментов будет по два в каждой карте.

Вероятно, наиболее сложная ситуация возникает при сравнении пептидных карт белков, имеющих сходные аминокислотные последовательности, но содержащих нерегулярные замещения, вставки или делеции (тип 5), как результат изменений в процессе дупликации гена. Естественно, пептидные карты двух таких молекул будут иметь тем больше сходства, чем меньше произошло такого рода изменений. Однако даже значительная гомология этого типа не всегда очевидна. Так, аминокислотные последовательности субъединиц ацетилхолинового рецептора обнаруживают ~40% гомологии [51] и дают различные пептидные карты [32] (рис. 7.1). Следует иметь в виду, что в таких случаях возможности метода ограниченны и необходима тщательная интерпретация результатов во избежание возможных ошибок.

7.3. Картирование пептидов на практике

7.3.1. Картирование по Кливленду

Искомый белок (меченый или без метки) может быть выделен из смеси с помощью традиционных биохимических методов (осаждение сульфатом аммония, хроматография на открытых колонках) или более современных подходов (например, иммунопреципитация [13] и аффинная хроматография [18, 29]). Однако часто очистка белка до гомогенного состояния этими методами бывает затруднена и на завершающей стадии используют систему с наиболее высокой разрешающей способностью — электрофорез в ПААГ — ДСН. В первоначальном варианте методики Кливленда [12] применялось слабое окрашивание белка в геле кумасси голубым [14] и затем быстрое обесцвечивание и вырезание соответствующей полосы мокрого геля.

В случае радиоактивно меченных белков гель извлекают из прибора для электрофореза, промывают его ~20 объемами дистиллированной воды для удаления компонентов буфера и затем высушивают без предварительной фиксации (если гель фиксировался в уксусной кислоте или метаноле, то элюирование интактного белка с регидратированного геля часто бывает затруднено). Высушенный гель затем подвергают радиоавтографии и вырезают нужную полосу белка, используя рентгеновскую пленку в качестве подложки.

Второй ДСН-гель готовят с такой концентрацией акриламида, в которой подвижность исследуемого белка составляет ~0,2 относительно положения фронта красителя (бромофенолового синего) (рис. 7.1). Применяются также гели, приготовленные с градиентом концентрации акриламида; они особенно полезны в

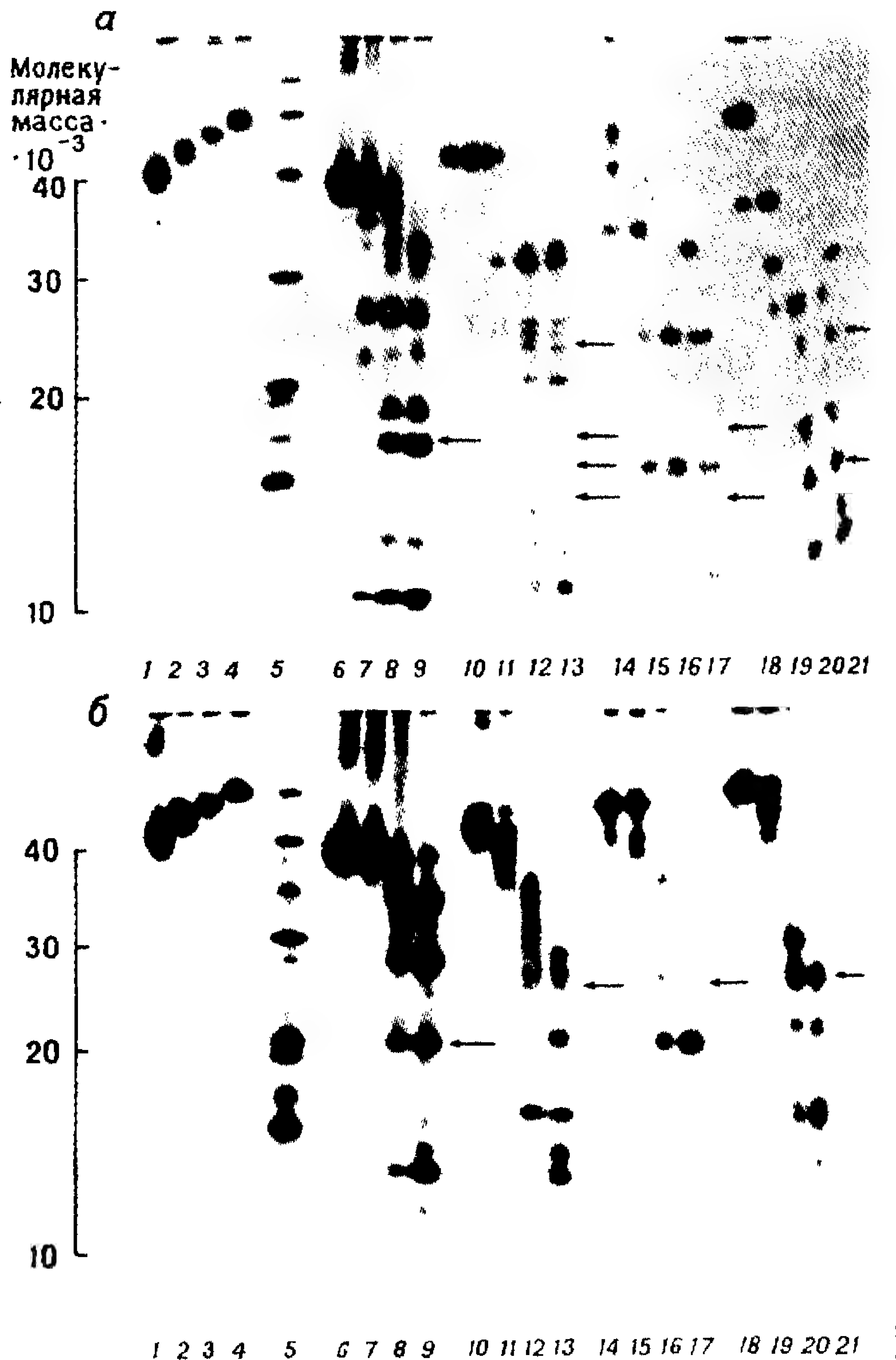


РИС. 7.1. Картирование на ПААГ в присутствии ДСН субъединиц ацетилхолинового рецептора. *а* — гидролиз протеазой V8: *1—4* — 5 мкг α-, β-, γ- и δ-субъединиц, *5* — белки-маркеры; *6—9* — α, *10—13* — β, *14—17* — γ и *18—21* — δ-субъединицы, гидролизованные протеазой V8 в количестве 0,0005, 0,005, 0,05 и 0,25 мкг соответственно; *б* — гидролиз папаином: *1—4*—5 мкг α-, β-, γ- и δ-субъединиц, *5* — белки-маркеры, *6—9* — α-, *10—13* — β-, *14—17* — γ- и *18—21* — δ-субъединицы, гидролизованные папаином в количестве 0,0001 0,001, 0,01 и 0,1 мкг соответственно. Стрелки указывают на полосы, обработанные реагентом Шиффа для обнаружения углеводов [32]. (С разрешения American Chemical Society.)

тех случаях, когда трудно предсказать размер образующихся фрагментов. Концентрирующий гель должен иметь сравнительно низкое содержание акриламида, чтобы не ограничивалась подвижность интактного белка или протеолитического фермента (если он используется), и достаточную длину для того, чтобы образец образовал компактную полосу до достижения разрешающего геля. Ячейки должны быть настолько широкими и глубокими, чтобы вместить куски регидратированного геля с белком и раствор фермента и обеспечить их свободный контакт.

Выбор способа расщепления зависит от природы белка-субстрата и осуществляется экспериментатором на основании своего опыта. Широко применяются протеолитические ферменты и среди них можно отметить протеазу V8, выделенную из фильтрата культуры *Staphylococcus aureus* [15]. Этот фермент расщепляет пептидную цепь по С-концу остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, но в соответствующем буфере гидролиз протекает только по остаткам глутаминовой кислоты [34]. В обычных буферных растворах ступенчатого гель-электрофореза по Леммли [40] протеаза V8 расщепляет связи, образованные обеими дикарбоновыми аминокислотами. Поскольку гидролиз осуществляется в концентрирующем геле, соответствующий фермент должен сохранять активность в 0,1%-ном (масс./об) растворе ДСН, а желательно и при более высокой концентрации детергента. В этих условиях активны и могут быть использованы протеаза V8 [4, 30], папаин [32], эластаза, α-химотрипсин [29], трипсин [4].

Если белок-субстрат находится в растворенном состоянии, то фермент добавляют к нему непосредственно и инкубируют смесь в течение определенного времени до нужной степени расщепления. Затем гидролизат переносят в гель и разделяют обычным путем [30, 31]. При этом нет необходимости инактивировать протеазу, поскольку она будет отделена от субстрата в разделяющем геле. Обычно после завершения гидролиза добавляют восстанавливающий агент и образец нагревают в течение 2—5 мин при 100 °С. Эта процедура способствует образованию более четких полос при электрофорезе и одновременно инактивирует фермент.

Чаще белок гидролизуют в зоне полиакриламида: раствор фермента (оптимально ~10 мкл) помещают в соответствующую лунку, которая уже содержит электродный буфер. Раствор фермента по составу должен быть аналогичным тому, в котором находится концентрирующий гель, но иметь несколько большую плотность, для чего добавляют 10—20% глицерина или сахарозы. Кусочек геля, содержащий белок-субстрат, осторожно опускают в лунку над раствором протеазы так, чтобы не нарушить компактность слоя. Полезно для приготовления второго

геля использовать более широкие спейсеры, чем для первого, но обычно несложно поместить кусочки геля в лунку пластины геля того же размера, при этом желательно достичь плотного прилегания, чтобы избежать возможности падения кусочка геля в раствор фермента и его разбрызгивания. Расположение геля с субстратом, как на «подушке» более плотного раствора фермента, способствует более эффективному гидролизу, поскольку при этом достигается равномерное распределение протеазы по всей поверхности трека.

При подаче напряжения белок-субстрат из геля и протеаза концентрируются, образуя узкие, прилегающие друг к другу зоны; после этого ток выключают (обычно на 30—60 мин) для прохождения ферментативного гидролиза. Активная нативная протеаза расщепляет некоторые из наиболее «чувствительных» связей денатурированного развернутого субстрата. Затем вновь подают напряжение и образовавшиеся фрагменты разделяются в разрешающем геле.

Для обнаружения пептидов на электрофореграмме в ПААГ — ДСН применяют несколько методов. В белок может быть предварительно введена радиоактивная метка (с использованием клеточного метаболизма или in vitro), в этом случае разделенные фрагменты детектируют методом авторадиографии или флуорографии [2]. Специфическая идентификация достигается при использовании аффинной метки (такой, как природный лиганд и его синтетические аналоги) [29] или с помощью ферментов, в частности киназ, способных вводить радиоактивные группы (при условии, что они играют роль субстратов). В более общем случае включение метки осуществляется иодированием доступных остатков тирозина [11, 53, 54, 45] и метаболически в культуре ткани [13] или органа [59] в среде, содержащей одну или несколько меченных аминокислот. При специфическом мечении радиоактивность вводится только в некоторые пептидные фрагменты; метод может быть очень информативным при исследовании локальной гомологии, такой, как, например, окружение лигандсвязывающего центра [29] или участков фосфорилирования.

Для окрашивания гелей применяют также реагенты общего типа — кумасси голубой [14], комплексы серебра [47, 48, 52] или более специфичные, например для идентификации гликопептидов [17, 28, 69] — реагент Шиффа [32], модифицированный вариант окрашивания комплексами серебра [16], лектины, содержащие радиоактивную [39] или флуоресцентную метку [23] (см. также гл. 8).

Полипептиды могут быть перенесены с геля на нитроцеллюлозные пластинки [7, 25, 67], положительно заряженные мембраны [24], диазотированную бумагу [10, 56] и обнаружены по

специфическому связыванию с меченными антителами [29] или лектинами [27, 33]. С помощью антисыворотки можно идентифицировать все фрагменты белка, а моноклональные антитела или лектины специфически связываются с одним или некоторым ограниченным числом фрагментов. Поскольку посредством антител можно обнаружить индивидуальный белок в смеси, эта методика позволяет провести сравнение двух белков, один из которых не был ранее выделен в очищенном состоянии. По Кливленду картируют обычно пептиды относительно больших размеров, и применение иммунных методов для их обнаружения целесообразно, поскольку высока вероятность содержания в них нерасщепленных линейных антигенных детерминант.

Для получения оптимального набора фрагментов белка с помощью протеолиза (по величине составляющих компонентов) испытывают различные нагрузки фермента при фиксированном количестве субстрата [12] (рис. 7.1). При отсутствии данных о чувствительности к протеолизу исследуемого белка (она может варьировать в широких пределах) начинают с нагрузки фермента 1 мкг на лунку геля. Затем уменьшают или соответственно увеличивают ее в 10 раз, если позволяет имеющееся в распоряжении количества белка. На основании полученных результатов выбирают оптимальные условия эксперимента.

Могут быть использованы также химические методы расщепления полипептидной цепи: обработка бромоцианом (по остаткам метионина) [9, 43, 50], муравьиной кислотой (по связям аспарагиновая кислота — пролин) [41, 58] или N-хлоросукцинимидом (по остаткам триптофана) [42]. В этих случаях кусочек геля с белком обрабатывается в пробирке реагентом, а затем образовавшаяся смесь фрагментов наносится для разделения на второй гель. Преимущество химических методов очевидно, когда исследуется небольшое количество немеченного белка и необходимо для проявления применять высокочувствительное окрашивание серебром, которому не мешает присутствие протеаз.

Опубликовано множество вариантов картирования пептидов в гелях. С помощью электрофореза в первичном геле можно разделить несколько белков, после чего из геля вырезают полоску, накладывают ее на другой гель, проводят ферментативный гидролиз, как описано выше, и вторично разделяют электрофоретически образовавшиеся фрагменты.

Таким образом, с небольшой затратой усилий могут быть получены пептидные карты нескольких белков, находящихся в смеси (при условии, что они обладают разными относительными подвижностями в первичном геле) [4, 41, 65]. Осложнения, возникающие при использовании этой методики, связаны с тем, что концентрация компонентов в исходной смеси может быть раз-

личной, а гидролиз проводится с одной нагрузкой фермента. Это может привести к неодинаковой степени расщепления белков и ошибочным выводам при анализе электрофореграммы.

В случае если белок доступен лишь в очень малых количествах, его фрагменты могут быть перенесены с геля электрофоретически на диазотированную бумагу, с которой они связываются ковалентно, или на нитроцеллюлозу, где осуществляется нековалентное взаимодействие. При наличии соответствующей антисыворотки или моноклональных антител фрагменты белка могут быть обнаружены на реплике с высокой степенью чувствительности. Так, смесь гидролизатов субъединиц ацетилхолинового рецептора из трех различных видов животных удалось разделить с помощью одномерного электрофореза [29] и затем полипептиды перенести на бумагу, содержащую диазофенилтиоэфирные группировки [56, 63]. Для обнаружения фрагментов конкретной субъединицы в смеси были использованы антисыворотки и моноклональные антитела, полученные к каждой индивидуальной субъединице рецептора, что значительно упростило их сравнительный анализ (рис. 7.2, *а—ж*). Пептидные карты оказались различными, но на карте *ж* с помощью моноклональных антител был обнаружен фрагмент с одинаковой подвижностью в каждом из трех треков — *4*, *5* и *6*. Это свидетельствовало о том, что рецепторы каждого вида обладают некоторой степенью гомологии, проявившейся в образовании фрагмента одного размера с идентичной линейной антигенной детерминантой во всех трех случаях.

Нет сомнения в том, что картирование по Кливленду в дальнейшем будет развиваться и совершенствоваться. Уже сейчас, например, становятся общедоступными эксперименты, в которых на основе содержащихся в клетке в очень малом количестве мРНК получают кДНК, клонируют ее и определяют нуклеотидную последовательность. Поли- и моноклональные антитела к синтетическим пептидам из выведенной последовательности используют для идентификации соответствующих белков на электрофореграммах.

7.3.2. Двумерное картирование пептидов

Очищенные белки подвергают гидролизу трипсином (иногда α-химотрипсином) в растворе, в суспензии [26] или в геле [19]. При небольшом количестве исходного материала необходимо проводить предварительно радиоактивное мечение [6, 19, 20]. Немеченые пептиды могут быть обработаны после разделения флуоресцентными реагентами, причем образующиеся производные в некоторых случаях по чувствительности обнаружения не уступают радиоактивной метке [21, 55, 60, 70].

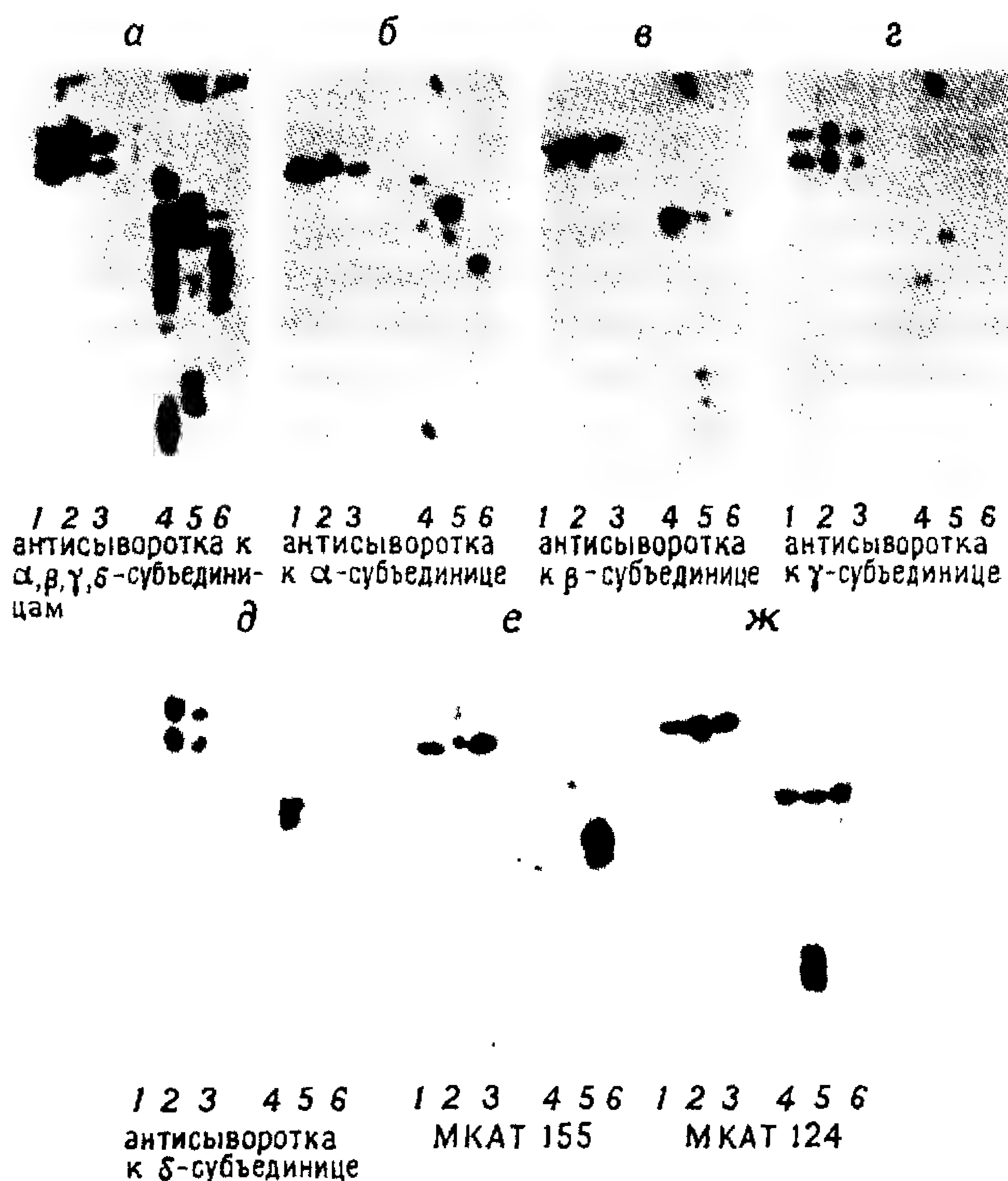


РИС. 7.2. Интактные субъединицы ацетилхолинового рецептора из *Torpedo* (I), *Electrophorus* (II), мышц быка (III) и их гидролизаты протеазой V8 разделены на 15%-ном ПААГ в присутствии ДСН и перенесены электрофоретически на диазотированную бумагу. *1* — I (10 нг); *2* — II (20 нг); *3* — III (50 нг); *4* — гидролизат I (40 нг, 1 : 10 по массе); *5* — гидролизат II (80 нг, 1 : 10); *6* — гидролизат III (100 нг, 1 : 10). Обнаружение с помощью смеси равных количеств антисывороток к α,β,γ,δ-субъединицам I (*а*), антисывороток к α,β,γ,δ-субъединицам соответственно (*б—д*) и моноклональных антител (МКАТ) к α- и β-субъединицам (*е* и *ж*) [8]. (С разрешения Chemical Society.)

Образцы белков, предназначенные для пептидного картирования, часто находятся в больших объемах. Для их концентрирования и одновременного удаления нежелательных компонентов буферов белок осаждают обработкой 50%-ной (масс./об.) трихлороуксусной кислотой (для осаждения большинства белков достаточно 2 ч при 4 °С) и отделяют центрифугированием. При работе с очень небольшими количествами радиоактивно меченных белков для «затравки» и полноты осаждения добавляют немеченный («холодный») белок-носитель (например, иммуноглобулин). Поскольку ни белок-носитель, ни протеаза не

содержат метки, их содержание в растворе лимитируется только объемом нанесения образца на пластинку (0,25—5 мкл). Общее содержание белка >100 мкг в пробе нежелательно, поскольку приводит к образованию размытых полос на карте и достаточно большая доля радиоактивного материала может остаться на старте.

Образец белка растворяют или суспендируют в летучем буфере (0,5 мл 50 мМ бикарбоната аммония), к которому добавляют фермент (для радиоактивных образцов 1—50 мкг, для немеченых белков в соотношении 1 : 100). Смесь оставляют на 6—24 ч при 37 °С. Иногда для полноты гидролиза бывает необходимо добавить вторую порцию трипсина, поскольку вследствие автопротеолиза этот фермент теряет активность во времени.

Радиоактивно меченные белки в кусочках геля уравновешивают аммонийбикарбонатным буфером и проводят протеолиз, как описано выше. Согласно некоторым методикам до ферментативного гидролиза, предлагается провести стадию алкилирования или окисления белка [26, 61]. Образующиеся небольшие фрагменты, более растворимые, чем исходный белок, пассивно элюируются с геля. Супернатантную жидкость концентрируют лиофилизацией, при этом удаляются летучие компоненты буфера.

Высушенную смесь коротких пептидов затем растворяют в небольшом объеме (10 мкл) электрофоретического буфера и наносят на стеклянные пластинки, покрытые слоем силикагеля или целлюлозы толщиной 0,1—1 мм. К сожалению, коммерчески доступные пластинки часто имеют неровное покрытие, что может быть обнаружено просматриванием пластинки на свет (темные полосы или пятна свидетельствуют о различной толщине слоя носителя). Забракованные пластинки можно использовать для предварительных проб: установления времени пробега, величины pH в электрофорезе или состава хроматографической системы растворителей. В качестве носителя могут быть использованы листы бумаги ватман 3 ММ [36, 37]. Несмотря на значительные потери пептидов в результате адсорбции, хроматография на бумаге применяется для контроля гомогенности пептидов (разд. 7.3.2.1).

Раствор образца следует наносить маленькими порциями (0,25 мкл) так, чтобы стартовая точка была как можно более компактной. Каждая порция раствора быстро высушивается с помощью фена или вентилятора. На пластинку наносят также несущие заряд окрашенные соединения, они мигрируют на определенное расстояние и служат для визуальной оценки процесса. Для электрофореза применяют буферы, содержащие пиридин, уксусную кислоту, воду, иногда бутанол [26, 60] (табл. 7.1). Для получения различных разделяющих систем можно варьиро-

Таблица 7.1. Условия двумерного разделения триптических пептидов на пластинках с тонким слоем силикагеля

Пластинки 200×200 мм с толщиной слоя 0,1—0,25 мм.

Первое направление: электрофорез
pH 3,5 пиридин — уксусная кислота — вода (2 : 20 : 978), 1000 В, 45 мин
pH 6,5, пиридин — уксусная кислота — вода (100 : 3 : 897), 1000 В, 40 мин
pH 4,7, бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (2 : 1 : 1 : 18)
Второе направление: хроматография при 25 °С
Хлороформ — метанол — аммиак (2 : 2 : 1)
Пропанол — аммиак (7 : 3)
Бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (97 : 75 : 15 : 60), pH 5,3

вать pH раствора. Удобно операции осуществлять в следующей последовательности: сначала электрофорез, а потом хроматографию; однако такой порядок не обязателен.

Электрофоретическая пластинка осторожно увлажняется соответствующим буфером так, чтобы не смазались точки нанесения образца, и включается напряжение 1000 В на 40—90 мин (для пластинки 200×200 мм). Следует указать, что этот эксперимент небезопасен и все электрические приборы время от времени должны проверять квалифицированные специалисты. По окончании электрофореза пластинку снимают и высушивают в течение ночи в вытяжном шкафу. Поскольку используемые растворители летучи, при полном высушивании не должно оставаться запаха уксусной кислоты. При сравнительном анализе нескольких образцов очень важно, чтобы электрофоретическая и хроматографическая процедуры повторялись в абсолютно одинаковых условиях.

Характер поведения пептидов в хроматографическом процессе определяется составом применяемой системы растворителей. Повышение содержания в ней органических компонентов увеличивает относительную подвижность гидрофобных пептидов, поскольку стационарная фаза гидрофильна. Широкое применение нашли несколько систем растворителей [26, 60], но для оптимизации условий разделения в конкретных случаях используются разнообразные варианты (табл. 7.1).

Для хроматографирования во втором направлении пластинки помещают в стеклянные камеры. Точки нанесения образцов должны быть на ~1 см выше уровня растворителя. Процесс продолжают до тех пор, пока растворитель достигнет или почти достигнет верхнего края пластинки (для пластинки размером 200×200 мм на это требуется около 5 ч). После высушивания на воздухе, если анализировались меченые образцы, проводят авторадиографию прямым путем или в случае изотопов с низ-

кой энергией опрыскивают хроматограмму раствором сцинтиллятора с последующей флуорографией [3].

Детекция немеченых пептидов осуществляется различными способами [55], но чаще всего с помощью флуорескамина в ацетоне [60]; образующиеся флуоресцирующие пятна далее исследуют под УФ-светом (366 нм) (гл. 8). Может проводиться непрерывная регистрация результатов в виде авторадиографических оттисков на рентгеновской пленке или фотографирования пластинок после обработки флуоресцентным реагентом (в течение ≤24 ч).

Если в результате сравнения полученных карт возникают сомнения относительно гомологичности двух белков, процедуру повторяют, нанося на одну пластинку равное количество каждого образца. После проявления хроматограммы совпадения или различия в положении пятен становятся более очевидными.

Проблемы, которые возникают при двумерном картировании, связаны с низким качеством пластинок (неравномерное покрытие), неправильным нанесением образца (избыточное количество белка или слишком малая его радиоактивность) и неоптимальными условиями проведения гидролиза белка и собственно процессов хроматографии и электрофореза. Следует иметь в виду, что хотя большинство пептидов в электрофоретическом буфере заряжены положительно, в смеси могут находиться и пептиды с отрицательным зарядом. Поэтому рекомендуется выполнить дополнительный эксперимент, для чего образец наносят по центру в нижней части пластинки и проводят электрофорез в течение 30 мин. Затем описанными приемами определяют подвижность пептидов в первом направлении и оптимальную продолжительность процесса в препаративном опыте. На рис. 7.3 приведено несколько двумерных пептидных карт для демонстрации результатов, которые могут быть достигнуты этим методом.

7.3.2.1. Контроль степени чистоты пептидов. Гомогенность пептидов может быть определена двумерным разделением на большом листе бумаги ватман 3 ММ (460×570 мм). В первом направлении — электрофорез в системе: пиридин — уксусная кислота — вода (10 : 100 : 2800), pH 3,6, 2,2 кВ, 80 мин (могут быть использованы системы с другими pH). Во втором направлении — хроматография в системе *н*-бутанол — пиридин уксусная кислота — вода (150 : 100 : 30 : 120). Локализация пятен флуорескамином или реагентом нингидрин-кадмий.

7.3.3. Пептидное картирование с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Известно три варианта аналитического картирования пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ): обращенно-фазовая (ОФ-ВЭЖХ), ионообменная и гель-проникающая хроматография.

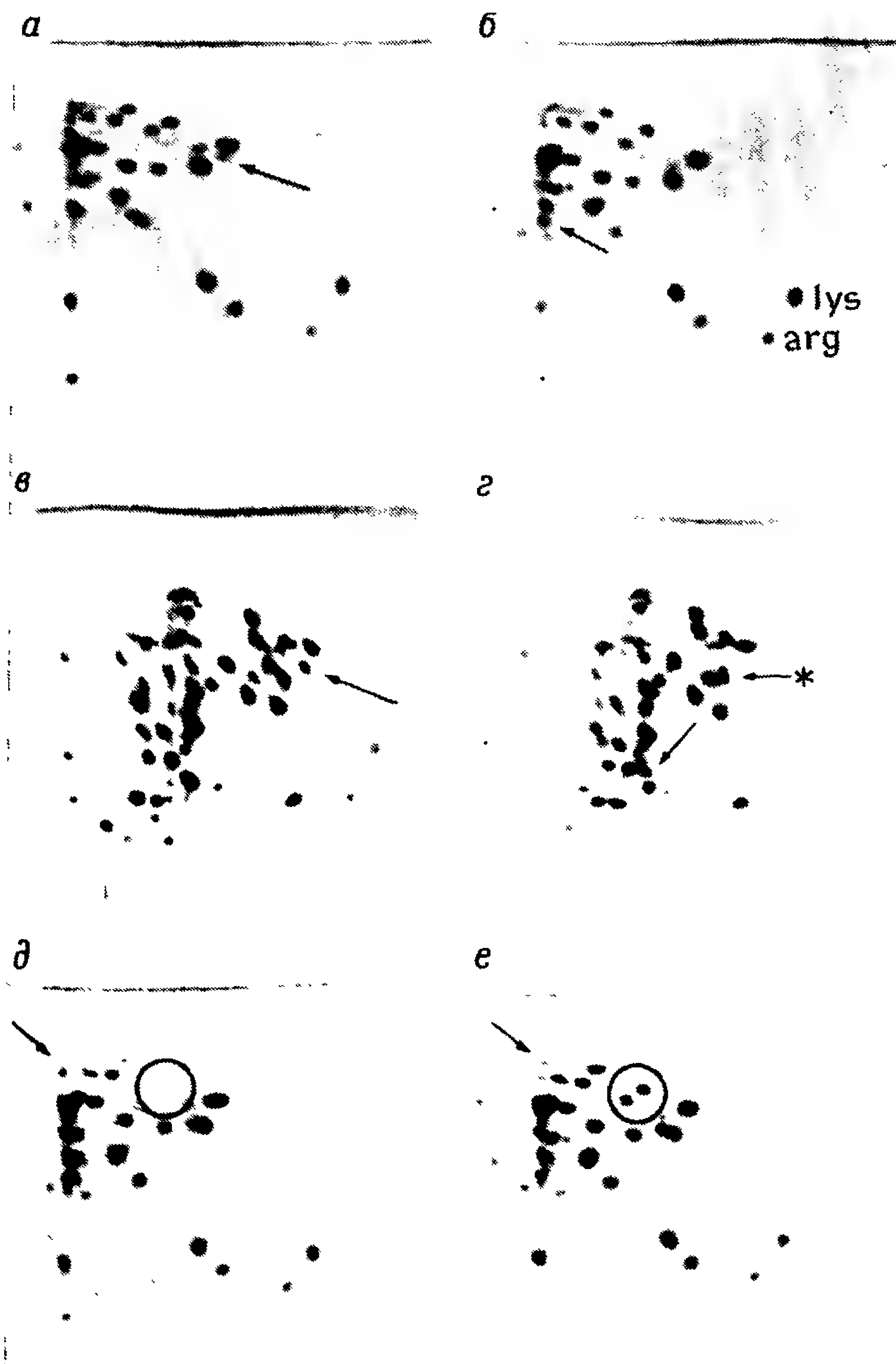


РИС. 7.3. Разделение триптических пептидов актинов моллюска и кролика на пластинках с тонким слоем силикагеля G. Триптические пептиды актинов моллюска (*а*) и кролика (*б*); стрелками отмечены уникальные пептиды; электрофорез, pH 3,5; хроматография: хлороформ — метанол — аммиак (2 : 2 : 1); *в* и *г* — триптические пептиды актинов моллюска (*в*) и кролика (*г*); стрелками отмечены уникальные пептиды, стрелкой со звездочкой — различие в положении пятен; электрофорез, pH 6,5; хроматография: пропанол — аммиак (7 : 3). *д* — гидролизат актина кролика, протеолиз и картирование в присутствии ДСН; *е* — тот же гидролизат в обычных условиях; некоторые пятна (обведены кружком) менее интенсивны в присутствии ДСН, в то же время другие (стрелки) более отчетливы; электрофорез, pH 3,5; хроматография: пропанол — аммиак (7 : 3). Все образцы нанесены в количестве 1 нмоль в 2,5 мкл (табл. 7.1) [60]. (С разрешения Academic Press.)

7.3.3.1. ВЭЖХ на обращенной фазе (ОФ-ВЭЖХ) с использованием градиентного элюирования [22, 57]. В настоящее время это наиболее широко используемый и наиболее эффективный метод разделения пептидов. Он основан на применении колонок, упакованных небольшими (3—10 мкм) пористыми частицами, поверхность которых покрыта алифатическими или фенильными группами, играющими роль неполярной стационарной фазы. Смесь небольших пептидов, полученных в результате ферментативного [8, 22, 49] или химического [68] расщепления белка, наносится на колонку в растворителе, выбранном таким образом, чтобы все или по крайней мере большинство компонентов гидрофобно связались с поверхностью упаковки. Затем через колонку пропускают подвижную фазу — водный раствор какого-нибудь органического растворителя с повышающимся градиентом концентрации (по объему). Пептиды элюируются в чрезвычайно узких зонах, первыми сходят гидрофильные, наиболее слабо взаимодействующие с гидрофобной стационарной фазой пептиды. Метод особенно эффективен в применении к пептидам, содержащим до ~50 аминокислот, и менее пригоден для разделения более крупных фрагментов.

Перед анализом ВЭЖХ на обращенной фазе белок гидролизуют трипсином или другим ферментом обычно в аммонийбикарбонатном буфере. Затем смесь пептидов может быть обработана специальными реагентами для повышения чувствительности обнаружения после фракционирования [8]. Недостатком предколоночной модификации является то, что вводимые флуоресцентные или поглощающие при определенной длине волны группы нивелируют структурные различия пептидов и таким образом снижают эффективность разделения.

В качестве стационарной фазы наиболее часто используют носители с углеводородными цепями C8 и C18, но коммерчески доступны и другие носители [57].

Решающее значение для процесса разделения имеет выбор подвижной фазы; предложено множество различных смесей растворителей и условий хроматографии для решения конкретных задач (более подробное обсуждение см. в работе [57]). Описаны попытки с помощью расчетных методов предсказывать времена удерживания пептидов для данной системы растворителей и упаковки колонки [5, 46, 71], но, как правило, в общем случае для установления степени сходства исследуемых образцов бывает достаточно качественного сравнения кривых элюирования.

В практике очень широко используют несколько систем растворителей. Так для уравновешивания колонки служит 0,1%-ный (об./об.) (0,013 М) водный раствор трифтороуксусной кислоты (ТФУ) [44]. После введения пептидной смеси для контроля связывания всех или большинства компонентов смеси пропускают

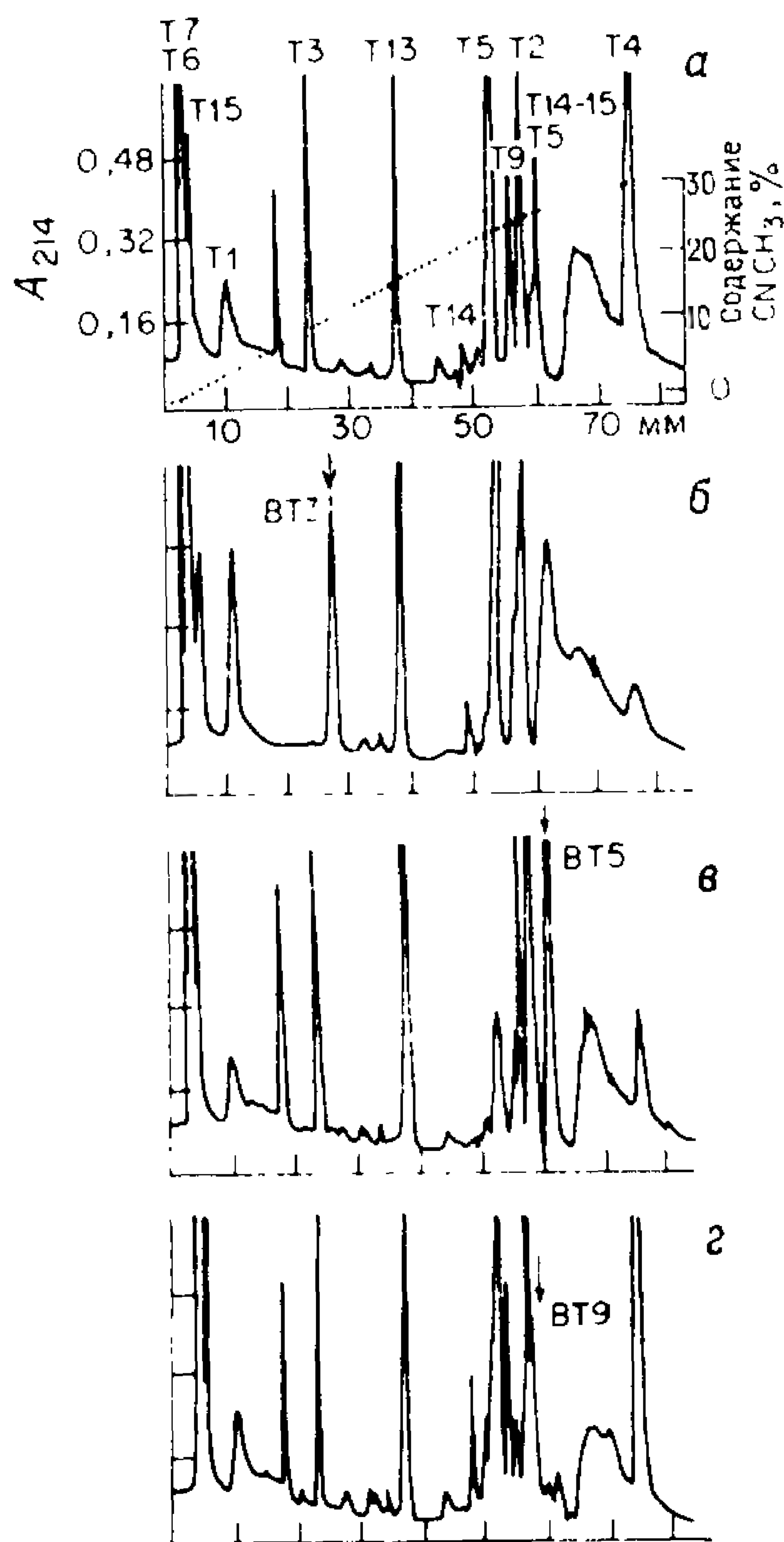


РИС. 7.4. Разделение пептидов триптических гидролизатов (0,8 мг) β-цепей гемоглобинов человека методом ВЭЖХ на обращенной фазе: *а* — нормальный гемоглобин; *б* — гемоглобин Cocody (p*I* 7,205); *в* — гемоглобин Avicenna (p*I* 7,225); *г* — гемоглобин Korle Bu (p*I* 7,210) [1]. (С разрешения Elsevier/North Holland, Biomedical Press.)

несколько объемов колонки 0,1%-ной ТФУ. Затем для элюирования индивидуальных пептидов на колонку подается линейный градиент концентрации ацетонитрила в 0,1%-ной ТФУ. Почти все пептиды, исследованные в этой системе, сходят с колонки ко времени повышения концентрации ацетонитрила до 60%. Для того чтобы избежать, возможного изменения коэффициента преломления из-за неполного смешения растворов в качестве второго растворителя применяют водный ацетонитрил (60% ацетонитрила + 40% воды), содержащий 0,1 ТФУ. Все используемые растворители должны быть высокой степени чистоты, поскольку даже незначительные примеси могут сконцентрироваться на колонке и затем элюироваться соответствующей концентрацией ацетонитрила. Оптимальная скорость потока 1 мл/мин, более медленное элюирование не улучшает разрешения. По окончании градиентного режима колонку вновь уравновешивают стартовым буфером, чтобы она была готова для нанесения следующего образца. Могут быть использованы другие буферные системы, такие, как ацетат аммония или фосфат натрия, при нейтральном pH, дающие другие результаты разделения.

В качестве практически осуществленного примера применения ОФ-ВЭЖХ для картирования пептидов можно привести сравнительный анализ молекул нормального и мутантных гемоглобинов [1, 62]. При исследовании β-цепей нескольких гемоглобинов человека их триптические гидролизаты были разделены на колонке С18, уравновешенной аммонийацетатным буфе-

ром в градиенте ацетонитрила [1]. В каждой хроматограмме пик одного пептида был смещен относительно положения пиков фрагментов нормального гемоглобина (рис. 7.4). Фракции пептидов с необычными временами удерживания были собраны и проанализированы их аминокислотные составы и последовательности. В каждом случае был найден единственный аминокислотный остаток, отличающийся от соответствующей аминокислоты нормального гемоглобина. Время разделения составило всего 80 мин.

7.3.3.2. Ионообменная ВЭЖХ. Второй метод, весьма часто применяемый в аналитических целях — ионообменная ВЭЖХ (ИО-ВЭЖХ), где связывание пептидов с ионогенными группами носителя происходит в результате взаимодействия зарядов. Элюирование осуществляется путем повышения ионной силы или изменения pH подвижной фазы, иногда одновременно с увеличением содержания органических растворителей [38, 64]. Эта методика дает наилучшие результаты в случае относительно небольших молекул, хотя определенные возможности имеются и для разделения белков [57]. Ионообменная ВЭЖХ основана на ионных взаимодействиях, которые «работают» и в «открытых» колонках классической ионообменной хроматографии. Образец наносится на колонку в растворе с низкой ионной силой и pH, при котором стационарная фаза и образец ионизованы, но обладают различными зарядами. Для элюирования пептидов через колонку пропускается раствор с повышающимся градиентом ионной силы или изменяющимся pH. Преимущество метода ИО-ВЭЖХ по сравнению с обычной ионообменной хроматографией заключаются в минимальном разбавлении образца во время разделения и очень чувствительных методах обнаружения. Как и в ВЭЖХ на обращенной фазе, на ионообменную колонку образец в случае необходимости может быть нанесен в большом объеме, поскольку пептиды должны связаться с носителем до начала градиентного элюирования.

7.3.3.3. Гель-проникающая ВЭЖХ. Третий метод — гель-проникающая ВЭЖХ — реже используется для аналитического картирования пептидов [66] главным образом из-за отсутствия колонок этого типа, пригодных для разделения сложных смесей небольших пептидов ($M<5000$). Однако имеются колонки, на которых можно фракционировать пептиды большего размера и белки; они применяются на стадиях очистки или обессоливания белков.

7.3.3.4. Методы обнаружения. Измерение оптической плотности флуоресцентного излучения и радиоактивности — эти методы применяются во всех видах ВЭЖХ при картировании пепти-

дов; значительно реже используют измерение коэффициента преломления и электрохимические методы [57].

Измерение оптической плотности при определенной длине волны до настоящего времени остается наиболее распространенным методом обнаружения пептидов в ВЭЖХ. Единственное условие его успешного применения — отсутствие поглощения в выбранной области у растворителя (особенно для второго, создающего градиент компонента). Система ТФУ — градиент концентрации ацетонитрила особенно удобна в этом отношении, поскольку делает возможным проведение измерения поглощения вплоть до 210 нм [44]. Определение можно осуществлять одновременно при нескольких длинах волн, что позволяет селективно идентифицировать пептиды, содержащие определенные аминокислотные остатки (тирозин, триптофан). В настоящее время фирмы предлагают детекторы, с помощью которых можно получать точные профили индивидуальных пиков хроматограммы, что облегчает оценку степени гомогенности и идентичности соединений.

При наличии очень небольших количеств пептидных фрагментов проводят их модификацию *о*-фталевым альдегидом или флуорескамином для последующего измерения флуоресценции [35]. Методика основана на том, что сфокусированное УФ-излучение определенной длины волны возбуждает флуорогенный реагент в проточной ячейке, а испускаемая при этом флуоресценция концентрируется линзой, расположенной под углом 90° к источнику света. Чувствительность обнаружения в этом случае повышается по сравнению с измерением поглощения на два порядка, но для модификации компонентов смеси после выхода с колонки требуется установка дополнительного насоса (разд. 8.16.3.1).

Радиоактивные пептиды идентифицируют с помощью проточных счетчиков или чаще измерением радиоактивности во фракциях с помощью подходящих гамма- или жидких сцинциляционных счетчиков.

7.4. Заключение

Наиболее эффективным методом разделения пептидов в настоящее время является ВЭЖХ на обращенной фазе. Этот метод отличается экспериментальной простотой, скоростью, высокой чувствительностью (особенно для немеченых образцов) и очень хорошей разрешающей способностью. Разделенные компоненты находятся в растворе, что облегчает их дальнейший анализ — определение аминокислотного состава и последовательности.

Литература

1. *Boissel J.-P., Wajcman H., Fabritius H., Cabannes R., Dominique L.*, Biochem. Biophysica Acta, **670**, 203—206 (1981).
2. *Bonner W. M., Laskey R. A.*, Eur. J. Biochem., **46**, 83—88 (1974).
3. *Bonner W. M., Stedman J. D.*, Anal. Biochem., **89**, 247—256 (1978).
4. *Bordier C., Crettol-Jarvinen A.*, J. Biol. Chem., **254**, 2565—2567 (1979).
5. *Browne C. A., Bennett H. P. J., Solomon S.*, Anal. Biochem., **124**, 201—208 (1982).
6. *Bryant M. L., Nalewaik R. P., Tibbs V. L., Todaro G. J.*, Anal. Biochem., **96**, 84—89 (1979).
7. *Burnette W. N.*, Anal. Biochem., **112**, 195—203 (1981).
8. *Chang J.-Y., Knecht R., Ball R., Alkan S. S., Braun D. G.*, Eur. J. Biochem., **127**, 625—629 (1982).
9. *Chen-Kiang S., Stein S., Udenfriend S.*, Anal. Biochem., **95**, 122—126 (1979).
10. *Christophe D., Brocas H., Vassart G.*, Anal. Biochem., **120**, 259—261 (1982).
11. *Christopher A. R., Nagpal M. L., Carroll A. R., Brown J. C.*, Anal. Biochem., **85**, 404—412 (1978).
12. *Cleveland D. W., Fischer S. G., Kirschner M. W., Laemmli U. K.*, J. Biol. Chem., **252**, 1102—1106 (1977).
13. *Copper J. A., Reiss N. A., Schwartz R. J., Hunter T.*, Nature (Lond.), **302**, 218—223 (1983).
14. *Diezel W., Kopperschlager G., Hoffmann E.*, Anal. Biochem., **48**, 617—620 (1972).
15. *Drapeau G. R., Boily Y., Houmard J.*, J. Biol. Chem., **247**, 6720—6726 (1972).
16. *Dubray G., Bezard G.*, Anal. Biochem., **119**, 325—329 (1982).
17. *Eckhardt A. E., Hayes C. E., Goldstein I. J.*, Anal. Biochem., **73**, 192—197 (1976).
18. *Einarson B., Gullick W., Conti-Tronconi B., Ellisman M., Lindstrom J.*, Biochemistry, **21**, 5295—5302 (1982).
19. *Elder J. H., Pickett R. A., Hampton J., Lerner R. A.*, J. Biol. Chem., **252**, 6510—6515 (1977).
20. *Feitelson M. A., Wettstein F. O., Stevens J. G.*, Anal. Biochem., **116**, 473—479 (1981).
21. *Fishbein J. C., Place A. R., Ropson I. J., Powers D. A., Sofer W.*, Anal. Biochem., **108**, 193—201 (1980).
22. *Fullmer C. S., Wasserman R. H.*, J. Biol. Chem., **254**, 7208—7212 (1979).
23. *Eurlan M., Perret B. A., Beck E. A.*, Anal. Biochem., **96**, 208—214 (1979).
24. *Gershoni J. M., Palade G. E.*, Anal. Biochem., **124**, 396—405 (1982).
25. *Gershoni J. M., Palade G. E.*, Anal. Biochem., **131**, 1—15 (1983).
26. *Gibson W.*, Virology, 62, 319—336 (1974).
27. *Glass W. F., Briggs R. C., Hnilica L. S.*, Anal. Biochem., **115**, 219—224 (1981).
28. *Green M. R., Pastewka J. V.*, Anal. Biochem., **65**, 66—72 (1975).
29. *Gullick W. J., Lindstrom J. M.*, Biochemistry, **21**, 4563—4569 (1982).
30. *Gullick W. J., Lindstrom J. M.*, J. Cell. Biochem., **19**, 223—230, (1982).
31. *Gullick W. J., Lindstrom J. M.*, Biochemistry, **22**, 3312—3320 (1983).
32. *Gullick W. J., Tzartos S., Lindstrom J.*, Biochemistry, **20**, 2173—2180 (1981).
33. *Hawkes R.*, Anal. Biochem., **123**, 143—146 (1982).
34. *Houmard J., Drapeau G. R.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 3506—3509 (1972).
35. *Hughes G. J., Winterhalter K. H., Wilson K. J.*, FEBS Letts., **108**, 81—86 (1979).
36. *Ingram V. M.*, Nature (Lond.), **178**, 792—794 (1956).
37. *Ingram V. M.*, Nature (Lond.), **180**, 326—328 (1957).

38. *Isobe T., Takayasu T., Takai N., Okuyama T.*, Anal. Biochem., **122**, 417—425 (1982).
39. *Koch G. L., Smith M. J.*, Eur. J. Biochem., **128**, 107—112 (1982).
40. *Laemmli U. K.*, Nature (Lond.), **227**, 680—685 (1970).
41. *Lam K. S., Kasper C. B.*, Anal. Biochem., **108**, 220—226 (1980).
42. *Lischwe M. A., Ochs D.*, Anal. Biochem., **127**, 453—457 (1982).
43. *Lonsdale-Eccles J. D., Lynley A. M., Dale B. A.*, Biochem. J., **197**, 591—597 (1981).
44. *Mahoney W. C., Hermodson M. A.*, J. Biol. Chem., **255**, 11199—11203 (1980).
45. *Markwell M. A. K.*, Anal. Biochem., **125**, 427—432 (1982).
46. *Meek J. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **77**, 1632—1636 (1980).
47. *Merril C. R., Switzer R. C., Van Keuren M. L.*, Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76**, 4335—4339 (1979).
48. *Merril C. R., Dunau M. L., Goldman D.*, Anal. Biochem., **110**, 201—207 (1981).
49. *Nelson N. C., Taylor S. S.*, J. Biol. Chem., **256**, 3743—3750 (1981).
50. *Nikodem V., Fresco J. E.*, Anal. Biochem., **97**, 382—386 (1979).
51. *Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikyotani S., Hirose T., Asai M., Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S.*, Nature (Lond.), **301**, 251—255 (1983).
52. *Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R.*, Anal. Biochem., **105**, 361—363 (1980).
53. *Parsons R. G., Kowal R.*, Anal. Biochem., **95**, 568—574 (1979).
54. *Salacinski P. R. P., McLean C., Sykes J. E. C., Clement-Jones V. V., Lowry P. R.*, Anal. Biochem., **117**, 136—146 (1981).
55. *Schiltz E., Schnackerz K. D., Gracy R. W.*, Anal. Biochem., **79**, 33—41 (1977).
56. *Seed B.*, Nucleic Acids Res., **10**, 1799—1810 (1982).
57. *Snyder L. R., Kirkland J. J.*, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, New York, 1979.
58. *Sonderegger P., Jaussi R., Gehring H., Brunschweiler K., Christen P.*, Anal. Biochem., **122**, 298—301 (1982).
59. *Stein B., Sussman H. H.*, J. Biol. Chem., **258**, 2668—2673 (1983).
60. *Stephens R. E.*, Anal. Biochem., **84**, 116—126 (1978).
61. *Stephens R. E.*, Biochemistry, **20**, 4716—4723 (1981).
62. *Sughihara J., Imamura T., Imoto T., Yanase T.*, Biochem. Biophys. Acta, **669**, 105—108 (1981).
63. *Symington J., Green M., Brackmann K.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **78**, 177—181 (1981).
64. *Takahashi N., Isobe T., Kasai H., Seta K., Okuyama T.*, Anal. Biochem., **115**, 181—187 (1981).
65. *Tijssen P., Kurstak E.*, Anal. Biochem., **128**, 26—35 (1983).
66. *Tomono T., Suzuki T., Tokunaga E.*, Anal. Biochem., **123**, 394—401 (1982).
67. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76**, 4350—4354 (1979).
68. *Van Der Rest M., Bennett H. P. J., Solomon S., Glorieux F. H.*, Biochem. J., **191**, 253—256 (1980).
69. *Weber P., Hof L.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **65**, 1298—1302 (1975).
70. *Whittaker R. G., Moss B. A.*, Anal. Biochem., **110**, 56—60 (1981).
71. *Wilson K. J., Honegger A., Stotzel R. P., Hughes G. J.*, Biochem. J., **199**, 31—41 (1981).
72. *Wold F.*, Ann. Rev. Biochem., **50**, 783—814 (1981).

Глава 8

АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

А. ДАРБРЕ (A. DARBRE, *Department of Biochemistry, King's College London, Strand, London WC2R 2LS, U.K.*), с участием Дж. Р. КЛАМПА (J. R. CLAMP, *Department of Medicine, Medical School, University of Bristol, University Walk, Birtol BS8 1TD, U.K.)*

8.1. Введение

В этой главе рассматриваются аналитические приемы, получившие широкое применение в химии белка (если они не обсуждаются в других разделах книги). Неискушенному читателю может показаться, что здесь дано слишком много альтернативных методов и в некоторых случаях вполне достаточно было бы привести один из них. Автор признает возможность такого рода критических замечаний, но подчеркивает, что нет такого метода, который оказался бы в одинаковой степени пригодным для всех белков, поскольку, с одной стороны, весьма различны природа исследуемых объектов и их доступность в количественном отношении; с другой — лаборатории, занимающиеся изучением белков, резко отличаются друг от друга по оснащенности реактивами, приборами и другими техническими средствами. В целях сокращения объема рассматриваемого здесь материала некоторые из методов, например изотахофорез и хроматофокусирование, не обсуждаются.

Все большее значение в химии белка приобретают проблемы загрязнения образцов посторонними примесями, поскольку чувствительность методов анализа повышается, а исследователю часто приходится иметь дело с очень малыми количествами вещества. Было показано, что источниками примесей при анализе аминокислот газожидкостной хроматографией могут быть отпечатки пальцев, грязное стекло, вода, соляная кислота, резиновые перчатки и более очевидные загрязнения — слюна, кусочки кожи, сигаретный дым [310]. Более 150 пептидов было обнаружено в одном отпечатке пальцев [242] (разд. 8.19.2.2).

Вполне вероятно, что в будущем применение высокочувствительных методов анализа аминокислот (на уровне ниже пикомольного) потребует проводить приготовление растворов всех реагентов и буферов и все операции по разделению белков в асептических условиях. Однако требования сегодняшнего дня касаются прежде всего стекла, воды и реагентов, которые должны быть высокой степени чистоты.

8.2. Стекло

Стекло, в частности трубки, используемые для гидролиза, должно быть очищено обработкой в течение ночи горячей смесью серная кислота — азотная кислота (3 : 1)*, отмыто и высушено в вертикальном положении в воздушном термостате при 110 °С. Не рекомендуется для очистки стекла использовать хромовую кислоту из-за возможного образования продуктов окисления, остающихся на поверхности. Перед использованием пробирок или трубок следует прокалить их в течение нескольких часов при 550—625° (поместив их в стеклянный сосуд, закрытый алюминиевой фольгой) для разрушения возможных примесей аминокислот; после такой обработки посуду надо хранить в закрытом пыленепроницаемом контейнере.

При работе с микрограммовыми количествами вещества становятся ощутимыми потери за счет адсорбции на стенках сосуда. Они могут быть сведены к минимуму обработкой поверхности стекла или соответствующей модификацией растворителя. В этом отношении пробирки из полипропилена или поликарбоната лучше, чем стеклянные. Пробирки из стекла могут быть обработаны силилирующим реагентом, например диметилдихлоросиланом в четыреххлористом углероде (2%-ный раствор [137]) или триметилхлоросиланом в толуоле (5%-ный). После вымачивания в течение 5 мин в указанных растворах растворителю дают стечь, стекло промывают ацетоном и высушивают в вертикальном положении в термостате при 110 °С.

Силанизируют также стеклянные пластинки для электрофореза в полиакриламидном геле [274, 309]. Для этого их моют детергентом, водой, ацетоном и погружают в 0,2%-ный раствор полификса D (фирма Desaga) в смеси этанол — вода (1 : 1) или опрыскивают этим раствором. После такой обработки пластинки сушат под инфракрасной лампой на расстоянии ~20 см (температура ~60 °С); соблюдение условий высушивания очень важно. Силанизированные пластинки можно хранить в течение нескольких недель.

Стекло может быть также обработано сначала 3-аминопропилтриметоксисиланом, а затем глутаровым альдегидом с последующим добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) и восстановлением борогидридом натрия или 1%-ным (масс./об.) раствором полиэтиленгликоля 20 000 в деионизованной воде и высушено при 110 °С [5].

Однако обработка стеклянных и пластиковых поверхностей разными реагентами может привести к их загрязнению, поэто-

* Во всех случаях, где это не указано особо, содержание растворителей в смеси дано в объемных соотношениях. — *Прим. перев.*

му для снижения адсорбционных потерь белков лучше прибегать к модификации растворителя. С этой целью удачно применены добавки к растворителю глицерина (до 50%-ной концентрации) и тритона Х-100 (до 0,2 ммоль) [356]. При работе в пластиковых емкостях может быть использован глицерин или тритон Х-100 для растворов как с низкой, так и с высокой ионной силой, а в стеклянных сосудах рекомендуется применять глицерин для растворов с низкой и тритон Х-100 с высокой ионной силой. Следует заметить, что адсорбционная способность белков весьма различна.

8.3. Вода

Для многих целей пригодна деионизованная вода. Система Milli-Q, включающая ионообменную колонку и углеродные фильтры, обеспечивает производство высокоочищенной воды, содержащей менее $5 \cdot 10^{-6}\%$ примесей органических веществ (фирма Millipore).

Трехкратная перегонка воды в стеклянном аппарате не избавляет от всех примесей. Для полного удаления аминокислот и аммиака рекомендуется кипятить воду перед дистилляцией с нингидрином (2—4 г/л). Для разрушения аминокислот может быть использован также гипохлорит, избыток которого восстанавливают и воду перегоняют [142].

Методика. К 2500 мл воды в 5 л сосуде для перегонки добавляют 0,5 г NaOH (гранул.), 6,5 мл 4—6% (масс./об.) раствора NaOCl и кипятят в течение ночи. Приливают 4 мл концентрированной H_2SO_4 (*осторожно!*) и 2 г $SnCl_2 \cdot 2H_2O$. Перегоняют в колбу, защищенную ловушкой с лимонной кислотой. Проверяют присутствие ионов хлора добавлением 1 г KI к 10 мл воды, если появляется желтое окрашивание, добавляют еще хлорид олова. Собирают 2 л дистиллированной воды. Лучше использовать в анализе свежеперегнанную воду. См. в разд. 8.16.1 определение чистоты цитратных буферов [142].

8.4. Соляная кислота

Некоторые партии коммерческой соляной кислоты содержат примеси аминокислот, которые могут быть удалены трехкратной перегонкой. Хранить очищенную HCl рекомендуется в небольших запаянных стеклянных ампулах, поскольку в большом объеме, который часто открывают, кислота быстрее загрязняется. Соляная кислота (12 М) может быть приготовлена также пропусканием газообразного HCl (через предохранительную склянку с серной кислотой) в воду до насыщения (сосуд с водой, в которую пропускают HCl, должен быть защищен ловушкой с лимонной кислотой).

Кипящая при постоянной температуре HCl (5,7 М) получается перегонкой концентрированной HCl, к которой добавлена очищенная вода (9 : 11). См. разд. 8.6.1 — использование HCl для гидролиза белков.

Тест на чистоту HCl. Выпаривают 1 мл HCl на роторном испарителе в потоке азота. Остаток растворяют в 100 мкл раствора с pH 2 (1 мл 6 М HCl в 100 мл воды) и 50 мкл его вводят в колонку аминокислотного анализатора. Для проверки на присутствие загрязнений пептидной природы нагревают 1 мл HCl при 150 °C 25 мин, выпаривают и анализируют, как описано выше. Для сравнения проводят «глухой» опыт с 50 мкл раствора с pH 2 [142].

8.5. Концентрирование растворов белков

Для концентрирования белков из разбавленных растворов применяется осаждение солями, кислотами и органическими растворителями (ацетон, метанол), ультрафильтрация, диализ, выпаривание, лиофилизация. Осуществлять эти операции тем сложнее, чем меньшее количество белка находится в растворе, например трихлороуксусная кислота не осаждает белок при его содержании 1—25 мкг [17].

Белки эффективно концентрируются с помощью электрофореза в ПААГ [63, 196, 276, 277, 382] или изотахофореза [283]. Применение электрофоретической процедуры для концентрирования макромолекул путем осаждения [308] или извлечения белков из неионных растворов с использованием мембран [3] может осложняться необратимой сорбцией белка на мембране. С этой проблемой сталкиваются также и при работе с жидкими мембранами [384, 385] (см. дальше). Белки из разбавленного раствора (100—800 нг/мл) были выделены осаждением после введения радиоактивной метки с помощью [^{3}H]-1-фторо-2,4-динитробензола [280]. Для «снятия» белков с ДЭАЭ-целлюлозы в высококонцентрированной форме использовался карбоксиметилдекстран [367].

Наиболее распространена как метод концентрирования растворов белков лиофилизация. При интенсивном охлаждении (ацетон, этанол или изопропанол в смеси с твердой углекислотой) раствор замораживают и удаляют воду и летучие буферы в вакууме масляного насоса, снабженного специальной ловушкой. Ловушка заполняется щелочью, если упариваются кислые растворы; концентрированная муравьиная кислота перед замораживанием должна быть разбавлена водой до 30%-ной концентрации.

Для быстрого удаления воды, органических растворителей и летучих буферов может быть использован специальный концентратор фирмы Savant (Speed-Vae Concentrator), в котором упа-

ривание происходит под вакуумом в низкоскоростной центрифуге с контролируемым температурным режимом. В наборе имеются центрифужные пробирки разного объема. Метод особенно удобен для концентрирования фракций с хроматографических колонок или секвенатора, он быстрее и удобнее, чем упаривание отдельных образцов в потоке азота.

Осадки белков, полученные после экстракции неполярными растворителями или в результате высушивания при высокой температуре, могут быть трудно растворимыми. Если белок находится в виде тонкой пленки, то для его растворения используют 1 *M* NaOH [1 ч, комнатная температура или 10-минутное (и более) нагревание до 100 °C].

Эффективны как растворители белка водный гексафтороацетон [48, 82] и трифтороуксусная кислота [236]. Структурированные белки типа коллагена и кератина после обработки H_2O_2 легко растворимы в 0,05%-ном ДСН в 1 *M* NaOH при 100 °C (что используется при определении концентрации этих белков с помощью биуретовой реакции) [130].

При высушивании в высоком вакууме замороженных растворов, содержащих микроколичества свободных аминокислот, коротких пептидов или других низкомолекулярных соединений, существует опасность значительных потерь вещества, приводящая к невозможности количественной оценки процесса в целом. Например, было обнаружено, что за 90 мин лиофилизации при вакууме 5—10 мм рт. ст. (охлаждение смесью C_2H_5OH+твердый CO_2) терялось 89% 2-[^{14}C]-L-фенилаланина и 86% N-ферулоилглицил-L-фенилаланина [378].

Для удаления нелетучих буферов, солей, надмуравьиной кислоты и других компонентов растворов белков используют диализ в диализных трубках (типа Visking). В распоряжении исследователей имеется также широкий набор коммерчески доступных целлюлозных фильтров, рассчитанных на диапазон молекулярных масс от 1000 до 50 000 (Spectrapor membrane, фирма Spectrum Medical Industries Inc.) Растворы белков могут быть сконцентрированы в аппаратах для ультрафильтрации. Следует иметь в виду, что существует вероятность потери белков в диализных трубках в результате адсорбции.

Для концентрации пептидов, растворенных в больших объемах натрийацетатного буфера (pH 7,5), содержащего 4 *M* мочевину, используют колонки с обращенной фазой типа Lichrosorb C_8. Контроль элюата, содержащего соли уксусной и муравьиной кислот, обычно осуществляют с помощью флуоресцентного детектора. Быстрое обессоливание от мочевины и буферных компонентов достигается с помощью мини-колонок [278] или специальных патронов фирмы Waters [16, 392] (см. также разд. 6.2.3).

Микроконденсатор, снабженный мембраной Centricon с малой адсорбционной способностью, позволяет быстро (30—60 мин) концентрировать небольшие объемы (2 мл) до 25—40 мкл в центрифуге с фиксированным угловым ротором. Обессоливание или замена буфера могут быть проведены одновременно с концентрированием (фирма Amicon — Scientific Systems Division).

Поскольку ДСН является денатурирующим агентом, часто возникает необходимость его полного удаления. Использование для этих целей электрофореза и анионообменной хроматографии приводит к низкому выходу белка. Рекомендовано проводить удаление ДСН путем так называемой ионопарной экстракции с помощью триэтил- или трибутиламмония, дающей высокие выходы (70—100%) в диапазоне от микрограммовых до миллиграммовых количеств белка [153].

8.5.1. Методики

Ниже приведено несколько примеров концентрирования белков различными методами.

8.5.1.1. Количественное извлечение белков из разбавленных растворов [396]. К 0,1 мл раствора белка приливают 0,4 мл метанола, перемешивают и центрифугируют 10 с при 9000 *g* (на этой и последующих стадиях). Добавляют 0,1 мл хлороформа (0,2 мл для образцов с высокой концентрацией фосфолипидов), перемешивают и центрифугируют 1 мин. Верхний слой отбрасывают, к нижней хлороформсодержащей фазе приливают 0,3 мл метанола, перемешивают и центрифугируют 2 мин. Отделяют супернатант и высушивают осадок в потоке воздуха.

Для электрофоретического контроля гомогенности выделенного образца растворяют его в 50—100 мкл ДСН (5%-ный раствор, масс./об.) или непосредственно в 50 мкл буфера, содержащего 5% ДСН.

Методика может быть использована как для растворимых, так и для гидрофобных белков, на получающиеся результаты не влияет присутствие в исходном растворе детергентов, липидов, солей, 2-меркаптоэтанола. При содержании в исходном растворе 40—120 мкг белка в 0,1 мл выходы составляют 92—100%.

8.5.1.2. Электрофорез с использованием жидких мембран [384, 385]. Электрофорез с нелинейным градиентом pH позволяет осуществить концентрирование белков с различными зарядами быстрее, чем изоэлектрофокусирование. Два наложенных друг на друга слоя, один из аминокислот (гистидина или валина) и другой из амфолитов (Servalyte), создают жидкую мембрану, служащую барьером для белка. Таким образом 200 мл раствора рибонуклеазы было сконцентрировано в 48,3 раза за 4 ч, выход белка составил 96,6% [385]. В системе, состоящей из фармалитов (pH 2,5—5,0), гистидина (p*I* 7,64) и амфолитов (pH 9—11), при напряжении 400 В за 5 ч были сконцентрированы на двух границах раздела фаз кислая и основная изоформы пероксидазы хрена (p*I* 4,0 и 8,4) [384].

8.5.1.3. Концентрирование микрограммовых количеств белка [237]. Выделение микрограммовых количеств белков из разбавленных растворов основано на осаждении трихлороуксусной кислотой с добавлением дезоксихолата. Детер-

гент, часто применяемый при выделении мембранных белков, затем удаляется экстракцией.

а) *Осаждение белка*

1. Добавляют 120 мкл дезоксихолата натрия (2%-ный, масс./об.) к раствору до конечной концентрации белка 80 мкг/мл. Перемешивают и оставляют стоять во льду 30 мин. Концентрация детергента может варьировать от 50 до 500 мкг/мл, не оказывая влияния на выход.

2. Приливают 10 мл холодной трихлороуксусной кислоты (24%, масс./об.) до конечной концентрации 6%. Оставляют стоять во льду в течение 1 ч до полного осаждения комплекса белок — детергент.

3. Центрифугируют при 2400 *g* и 4 °С в бакет-роторе 45 мин.

4. Осторожно отделяют супернатант отсасыванием.

5. Растворяют осадок в 0,5 мл 62,5 мМ трис-HCl (pH 6,8), содержащего 3% ДСН, доводят раствор до 0,5 М по $NaHCO_3$ (конечный pH 8,8).

6. Диализуют раствор в течение ночи при комнатной температуре против 2 л 6,25 мМ трис-HCl (pH 6,8), содержащего 0,3% ДСН.

7. Лиофилизуют раствор в склянках (7 мл) с завинчивающимися крышками или пробирках.

б) *Экстракция детергента*

1. Добавляют к высушенному образцу 1 мл экстракционной смеси: ацетон — уксусная кислота — триэтиламин (90 : 5 : 5).

2. Быстро переносят раствор в коническую центрифужную пробирку.

3. Оставляют стоять во льду в течение 1 ч для осаждения белка.

4. Центрифугируют в настольной центрифуге при комнатной температуре.

5. Удаляют супернатант отсасыванием.

6. Промывают осадок сначала 1 мл экстракционного раствора и затем 1 мл ацетона.

7. Высушивают под азотом. Выход 40—80%.

8.6. Исчерпывающий гидролиз белков для аминокислотного анализа

Гидролиз белков кислотой или щелочью приводит к потере некоторых аминокислот и их производных. В общепринятых условиях исчерпывающего гидролиза (6 М HCl, 18—24 ч, 110 °С [266]) полностью разрушаются триптофан, аспарагин, глутамин, гликозиды, эфиры, образованные карбоксильными сульфо- и фосфорными группами, частично теряются серин, треонин и тирозин. Цистин и метионин частично разрушаются или окисляются до цистеиновой кислоты и метионинсульфона соответственно. Пептидные связи, включающие остатки валина, изолейцина и лейцина, гидролизуются трудно, и продолжительность гидролиза образцов, содержащих эти аминокислоты, увеличивают до 48, 72, 96 и даже 120 ч. Скорость высвобождения и деструкции индивидуальных аминокислот зависит в основном от природы белка и присутствия в нем солей и металлов (в металлопротеинах). Обычно кинетические кривые высвобождения серина, треонина и других лабильных остатков экстраполируют к нулевому времени гидролиза, а аминокислот с разветвленной боковой цепью — к бесконечному времени [372]. Однако может быть принято допущение, что за 24 ч теряется 10% серина и 5% трео-

нина. Окисление во время гидролиза метионина и частичное превращение тирозина в 3-хлоропроизводное может быть предотвращено добавлением к 6 М HCl соответственно меркаптоэтанола и фенола. Гидролиз белков для аминокислотного анализа подробно обсуждается в ряде обзоров [27, 106, 220, 266, 293, 317, 327].

8.6.1. Методики кислотного гидролиза

8.6.1.1. Соляная кислота. Для гидролиза используют кипящую при постоянной температуре соляную кислоту (разд. 8.4) или продажную 6 М HCl высшего качества с добавкой 0,02% меркаптоэтанола и 0,25% (масс./об.) фенола. Для удаления следов кислорода пропускают через кислоту в течение 5 мин поток азота.

Приготовление образцов для гидролиза. Пробирки или ампулы, которые могут быть изготовлены путем запаивания коротких трубочек из стекла пирекс, в целях очистки следует обработать, как описано в разд. 8.2. Берут навеску (1—5 мг) высушенного на воздухе или лиофилизованного белка (взвешивают прямо в ампуле); можно использовать и раствор белка, при этом лиофилизацию аликвотной части раствора проводят также в ампуле. Анализируемый образец не должен содержать солей, поэтому используют летучие буферные растворы.

Добавляют к осадку 6 М HCl (1 мл на 5 мг белка или при меньших количествах 10—200 мкл). Вращением ампулы в пламени кислородно-газовой горелки под углом 45° разогревают стекло в верхней части и оттягивают его так, чтобы образовался «перешеек» с диаметром ~1 мм. Чтобы не обжечь руки, можно припаять к ампуле небольшую стеклянную трубку. Замораживают содержимое ампулы в бане (ацетон с твердой углекислотой), присоединяют ее к вакуумной линии с помощью короткой резиновой или тайгоновой трубки и откачивают воздух на масляном насосе ниже остаточного давления $5 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст. При работе одновременно с несколькими образцами удобно использовать стальную или стеклянную систему (рис. 8.1). Ампулы одеваются на боковые отростки на пробках. Трехходовой кран в положении *1* позволяет включать и отключать вакуум.

В процессе вакуумирования (обычно 3—5 мин бывает достаточно) образец должен находиться под наблюдением. Если масса в ампуле начинает подниматься или «вскипать», то на короткое время к верхней ее части подводят тепло. Если эта процедура не помогает, на мгновение открывают кран *1* и тут же его закрывают. При необходимости повторяют эту процедуру несколько раз. Второй трехходовой кран в положении *2* присоединен к баллону с азотом, что делает возможным проводить попеременно удаление воздуха из системы и наполнение ее азотом до полного исключения кислорода. В процессе вакуумирования рекомендуется осторожно разморозить содержимое ампулы для удаления растворенного кислорода.

По завершении вакуумирования при работающем насосе с помощью узкого пламени кислородной горелки отпаивают ампулы по перешейку.

Описана методика, позволяющая подготовить для проведения кислотного или щелочного гидролиза за 1 ч 12 образцов в вакуумном эксикаторе [302].

Условия гидролиза. Ампулу помещают в термостат с циркулирующим воздухом, прогретым до 110 °С; точный температурный контроль процесса очень важен [266]. Удобно использовать для этих целей термостат газожидкостного хроматографа.

По окончании гидролиза (т. е. через 24, 48 или 72 ч) ампулу осторожно центрифугируют. Затем с помощью напильника (или стеклореза) на верхней части ампулы делают насечку и прикосновением раскаленной стеклянной

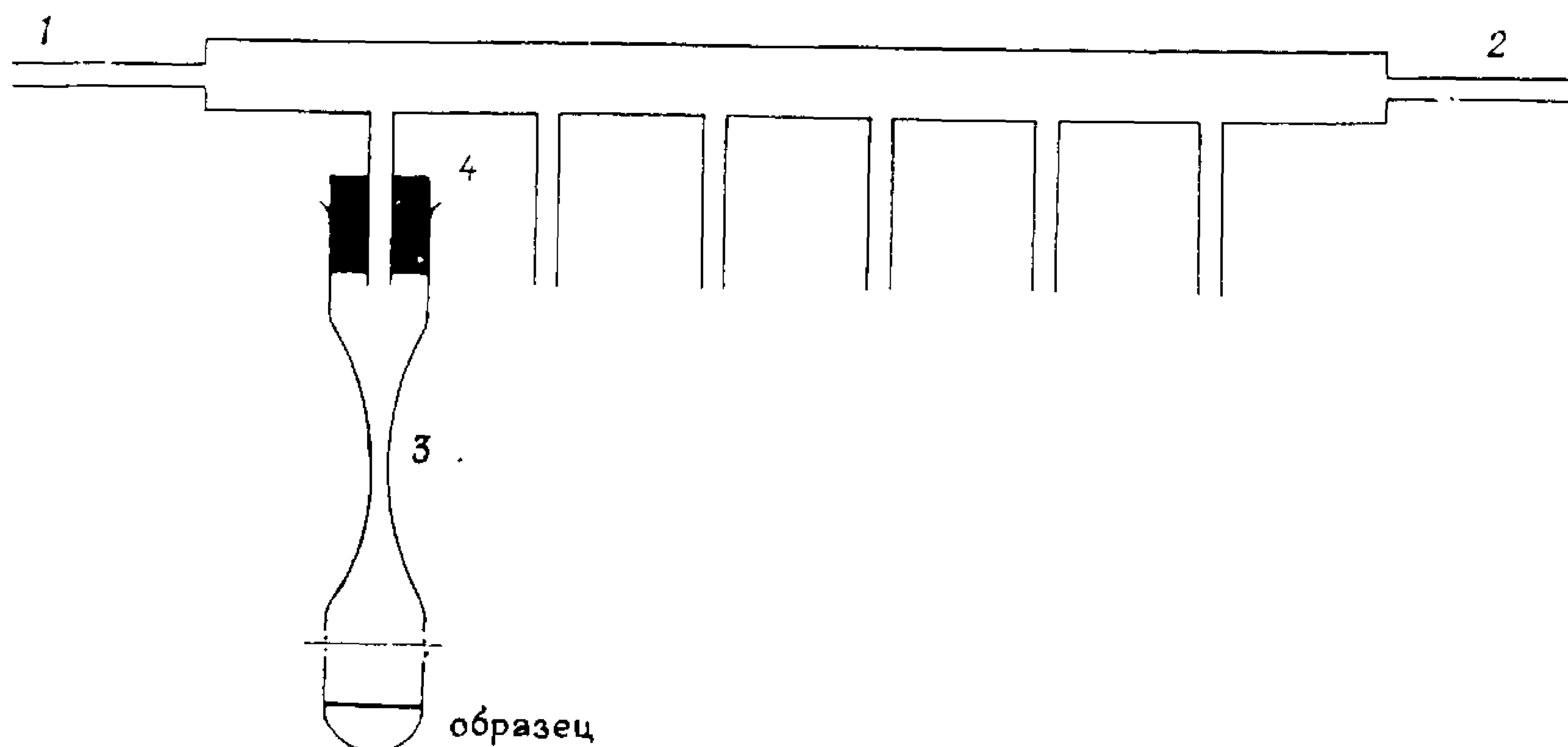


РИС. 8.1. Приспособление для вакуумирования ампул для гидролиза белков. Стальной трубопровод (наружный диаметр 20 мм) имеет шесть боковых отростков с отверстиями (длина 65 мм и наружный диаметр 6 мм). *1* и *2* — места трехходовых кранов. Ампулы для гидролиза имеют узкую шейку *3* и присоединяются с помощью пробки из силиконовой резины *4*.

трубки к смоченной водой насечке отламывают верхний конец и оплавляют острый край. Невскрытые ампулы хранят при —20 °С.

Для быстрого удаления соляной кислоты используют поток азота, роторный испаритель или скоростной вакуумный концентратор. Если гидролизу подвергалось много образцов, то можно их лиофилизовать. Для этого закрывают ампулы пленкой типа парафильм, делают в ней небольшие отверстия, замораживают в бане (ацетон — твердая углекислота) и помещают в вакуумный эксикатор над твердым NaOH или KOH (KOH в форме чешуек). Лиофилизуют на масляном насосе, снабженном ловушкой со щелочью, обычно в течение ночи. В условиях такого достаточно медленного удаления HCl, хотя этот способ общепринят, происходит дальнейшее разрушение остатков серина и треонина, что приводит к артефактным пикам на хроматограммах аминокислот [266].

Описана методика быстрого удаления соляной кислоты из большого числа гидролизатов белков без вспенивания, основанная на использовании центрифуги [195]. (См. разд. 8.5).

Перед нанесением аликвоты раствора на колонку анализатора рекомендуется профильтровать гидролизат через мембрану Millipore (0,45 мкм).

8.6.1.2. Методика быстрого гидролиза. Быстрый гидролиз свободных и присоединенных к носителям пептидов проводится в следующих условиях [397]: смесь пропионовая кислота — 12 М HCl (1 : 1), вакуум, 160 °С, 15 мин. Для количественного определения серина в образце температуру гидролиза снимают на 10 °С.

8.6.1.3. Гидролиз в незапаянных ампулах. В некоторых случаях, если в лаборатории нет кислородных горелок, гидролиз белка проводят в сосудах, снабженных краном для вакуумирования [89]. Реакционные пробирки этого типа выпускаются фирмой Pierce.

Гидролиз может быть проведен в атмосфере азота. Взвешивают белок или упаривают раствор непосредственно в небольшом сосуде с завинчивающейся крышкой с тефлоновым вкладышем. Добавляют 100—150 мкл 6 М HCl, продувают азотом и немедленно закрывают сосуд, обработка ультразвуком

на этой стадии способствует удалению растворенного воздуха [193]. Гидролиз проводят в алюминиевом блоке при 155 °C в течение 20 мин. Этого времени обычно бывает достаточно для достижения результатов, аналогичных полученным в классических условиях (110 °C, 22 ч), но гидролиз может быть и более продолжительным [142].

Результаты аминокислотного анализ рибонуклеазы после быстрого (145±2 °C, 4 ч) и обычного (110°±1 °C, 24 ч) гидролизов были идентичными. Авторы подчеркивают, однако, что для получения достоверных данных предварительно должны быть построены графики зависимости выходов аминокислот от времени гидролиза [193, 317].

8.7. Триптофан

В условиях кислотного гидролиза соляной кислотой триптофан практически полностью разрушается, особенно если белковая молекула содержит углеводные компоненты. Были предприняты попытки получить лучшие результаты; для этого к HCl добавляли тиогликолевую кислоту или соляную кислоту заменяли на *п*-толуолсульфокислоту, метансульфокислоту или меркаптоэтансульфокислоту (см. методики в разд. 8.7.1).

Наилучшие результаты по триптофану дает альтернативный кислотному щелочной гидролиз, однако при этом молярные соотношения аминокислот должны рассчитываться из данных независимых анализов кислотных гидролизатов [168]. При проведении щелочного гидролиза щелочную среду создают с помощью $Ba(OH)_2$ [318], NaOH [168] и LiOH [226]. В качестве внутреннего стандарта используют 5-метилтриптофан; по его выходу вносят поправку на деструкцию триптофана [404], следует иметь в виду, что на некоторых колонках 5-метилтриптофан элюируется совместно с лизиноаланином, образующимся в процессе щелочного гидролиза [419].

8.7.1. Определение триптофана после щелочного гидролиза белка

8.7.1.1. Методики.

Методика 1. Использование NaOH [168].

Реагенты. Продажный частично гидролизованный крахмал (50 г) промывают ацетоном, сушат и используют в качестве антиоксиданта.

1-%ный октиловый спирт в толуоле для подавления вспенивания.

50%-ный NaOH (масс./об.) разбавляется непосредственно перед употреблением.

Методика. К 1—5 мг белка в полипропиленовой центрифужной пробирке (109×5,0 мм) добавляют 25 мг крахмала, 0,5 мл 4,25 М NaOH (или 0,1 мл раствора белка и 0,5 мл NaOH) и 5 мкл 1%-ного октилового спирта. Пробирку помещают в запаянную с одного конца трубку из пирекса; верхнюю часть трубки оттягивают в пламени газовой горелки (без нагревания пластикового вкладыша). Нижнюю часть этой незапаянной еще ампулы с центрифужной пробиркой охлаждают в бане (ацетон + «сухой» лед), не замораживая содержимого. Ампулу вакуумируют до остаточного давления $<5\cdot10^{-2}$ мм

ртутного столба и запаивают. Нагревают при 110 °С обычно в течение 16—24 ч или более (до 96 ч); если в белке имеются связи Ile-Trp или Val-Trp, то гидролиз ведут при 135 °С в течение 48 ч.

Охлажденную пробирку осторожно открывают, добавляют 0,5 мл 0,20 М Na-цитратного буфера (pH 4,25). Раствор с помощью пастеровской пипетки переносят (с последующими промывками) в мерную колбу объемом 5 мл, содержащую 420 мкл 6 М HCl, охлажденной в «сухом» льду. Доводят объем до 5 мл цитратным буфером.

Замечание. Триптофан анализируют на короткой катионообменной колонке (80×9 мм) [267] с Na-цитратным буфером (pH 5,4). Нейтральные и кислые аминокислоты выходят с колонки вместе за 20 мин, триптофан — на 35-й минуте, лизиноаланин (образующийся во время щелочного гидролиза) на 53-й минуте; затем элюируются Lys (65 мин), His (80 мин) и NH_3 (95 мин). Причиной того, что для анализа не применяют обычный буфер с pH 2,2, является частичная потеря (10%) Trp при 25 °С. Выходы триптофана составляют 100±3%.

Методика 2. Использование LiOH [226]. Для гидролиза белка используют пробирки с завинчивающейся пробкой с тефлоновым вкладышем (1 мл 4 М LiOH на 25 мг образца). Пробирку с образцом продувают азотом, замораживают в бане с ацетоном и «сухим» льдом и плотно закрывают. Гидролизуют в течение 20 ч при 110 °С или 4 ч при 145 °С, что дает приблизительно одинаковые результаты. Гидролизат охлаждают и нейтрализуют 85%-ной ортофосфорной кислотой; доводят до определенного объема. Аликвоту разбавляют 0,2 М фосфатным буфером (pH 7,0) для анализа.

Замечание. Экстраполяция к нулевому времени гидролиза показала, что за 4—8 ч при 145 °С разрушается ~5% Trp. При сравнении двух методик щелочного гидролиза найдено, что лучшие результаты дает применение LiOH.

8.7.2. Определение триптофана после кислотного гидролиза белка

8.7.2.1. Методики.

Методика 1. Использование HCl с добавкой тиогликолевой кислоты [246]. Гидролизуют белок со свежеприготовленной 6 М HCl, содержащей 4% тиогликолевой кислоты, при 108—110 °С 24—64 ч. Выход Trp ~90%. Выходы других аминокислот, за исключением пролина, не меняются. Углеводы в небольших количествах не мешают анализу; в то же время при 50-кратном молярном избытке глюкозы Trp в белке не был обнаружен.

Методика 2. Использование *п*-толуолсульфокислоты [223]. *п*-Толуолсульфокислоту перекристализовывают из соляной кислоты и тщательно освобождают от HCl путем высушивания в вакууме при 45 °С над NaOH (гранул.) (тест на отсутствие ионов хлора — реакция с 1%-ным раствором $AgNO_3$ в 50%-ной HNO_3).

Гидролизуют 2—4 мг белка в 1 мл 3 М *п*-толуолсульфокислоты, содержащей 0,2% (масс./об.) 3-(2-аминоэтил)индола, смесь вакуумируют ($2 \cdot 10^{-2}$—$3 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст.) при 110 °С в течение 24, 48 или 72 ч. Охлаждают, добавляют 2 мл 1 М NaOH, доводят объем до 5 мл, фильтруют и берут аликвоту на анализ. Одновременно с триптофаном определяются и другие аминокислоты. Образец должен содержать не более 2 мг углеводов.

Методика 3. Использование меркаптоэтансульфокислоты [292]. Гидролизуют белок в 1 мл 3 М меркаптоэтансульфокислоты при 110 °±2 °С 24 и 72 ч. Охлаждают, добавляют 2 мл 1 М H_2SO_4 и количественно переносят в 5 мл колбу.

Замечание. Эта методика приводит к выходам лучшим, чем методика 1, и почти таким же, как методика 2. В химотрипсине после 22- и 72-часового

гидролиза найдено 96 и 91% Trp соответственно. Методика рекомендуется только для чистых белков.

Методика 4. Использование метансульфокислоты [343]. 4 М метансульфокислоту готовят разбавлением концентрированной кислоты с добавкой твердого 3-(2-аминоэтил)индола до концентрации 0,2% (масс./об.). Реагент продувают азотом и хранят при 4 °С. Препарат поставляет фирма Pierce. Белок (0,2—2,0 мг) гидролизуют в вакууме ($2\cdot10^{-2}$ мм рт. ст.) при 115 °С, 22, 48 и 96 ч в 1 мл метансульфокислоты (0,3 мл при количестве образца <1 мг). Частично нейтрализуют 3,5 М NaOH, доводят до определенного объема. Центрифугируют или фильтруют перед нанесением на колонку анализатора.

Замечание. Потери Trp (3,2%), Thr (5,9%), Ser (9,6%) меньше, чем в методике 2. Однако при содержании углеводов в белке >20% потери Trp становятся значительными и его количественное определение невозможным [172].

8.7.3. Определение триптофана в интактном белке

Триптофан в интактном белке может быть определен спектрофотометрически [103, 128, 349], флуорометрически [337] или колориметрически после перевода в окрашенное производное [11, 14, 334, 351]. На ограниченном числе белков были опробованы метод магнитного кругового дихроизма при 293 нм [13] и сцинтилляционный метод с использованием 3-диазо-1,2,4-[5-^{14}C]триазола [97]. На пикомольном уровне триптофан был определен по модифицированной реакции Пиктет-Шпенглера: смесь кипятят с феррицианидом калия и формальдегидом, количество образовавшегося 9-гидроксиметил-β-карболина определяют спектрофотометрически или методом ВЭЖХ на обращенной фазе [174].

Триптофан присутствует в белках в наименьших по сравнению с другими аминокислотами количествах, поэтому его тщательный анализ делает возможным прецизионное определение молекулярной массы белка.

8.7.3.1. Определение с 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом [11]

Реагенты

Мочевина, перекристаллизованная из смеси этанол — вода.

2-Гидрокси-5-нитробензилбромид (ГНБ-Br).

Трихлороуксусная кислота (ТХУ), 50%-ная.

Методика. Анализируемый белок инкубируют при 37° 16—20 ч в 1 мл 10 М мочевины, подкисленной до pH 2,7 концентрированной HCl, охлаждают до комнатной температуры и добавляют (самотеком из пипетки, погруженной в раствор белка) при размешивании на магнитной мешалке 5 мг ГНБ-Br в 0,1 мл сухого ацетона. Образующийся осадок (в основном продукт гидролиза реагента) удаляют центрифугированием.

Модифицированный белок пропускают через колонку (230×11 мм) с сефадексом G-25 (грубая фракция), уравновешенную 0,18 М уксусной кислотой (pH 2,7) или 10 М мочевиной (pH 2,7). В этих условиях белок остается в растворе. Элюируют со скоростью 100 мл/ч, собирая фракции по 1—4 мл. Белок осаждают 50%-ной ТХУ, добавляя ее в раствор до конечной концентрации 5%. Если использовалась мочевина, то перед добавлением ТХУ раствор разбавляют пятикратным объемом воды. Элюат оставляют при 4 °С на 30 мин

или на ночь, образовавшийся осадок отделяют путем центрифугирования, промывают дважды 5 мл раствора этанол — HCl (2 мл концентрированной HCl + 98 мл 95%-ного этанола). В заключение осадок растворяют в 1 мл концентрированной HCl, 0,1 мл этого раствора подщелачивают 2,5 М NaOH до pH 12, доводят общий объем раствора до 2,5 мл. Измеряют поглощение при 410 нм ($\varepsilon_M = 18\,000$). Для проведения аминокислотного анализа соответствующие аликвоты гидролизуют 6 М HCl.

8.8. Остатки амидов дикарбоновых аминокислот

В условиях обычного кислотного гидролиза (6 М HCl) аспарагин и глутамин превращаются соответственно в аспарагиновую и глутаминовую кислоты. Общее число амидов дикарбоновых аминокислот может быть определено по количеству выделяющегося аммиака в селективных условиях кислотного гидролиза (концентрированная HCl, при 37 °С, 10 сут или 2 М HCl, 100 °С, 2—8 ч). Одновременно происходит незначительное деаминирование остатков серина, треонина, цистина и триптофана. Порция гидролизата в микродиффузионном аппарате Конвея подщелачивается, и после диффузии в течение ночи аммиак определяется по реакции с нингидрином фотометрическим методом [401]. Глутамин более легко деамидируется, чем аспарагин [32]. Амиды аспарагиновой и глутаминовой кислот могут быть определены раздельно химическим и ферментативным методами [369]. См. обзор [8].

Белки даже после диализа часто содержат свободный аммиак, от которого освобождаются пропусканием раствора белка через колонку с катионообменником в H^+-форме.

8.8.1. Методики определения амидов

8.8.1.1. Диффузионный метод [401].

Контрольный опыт. Растворяют 10 мг белка в 1 мл 0,03 М HCl в метаноле и осаждают 2 мл этилового эфира. Центрифугируют. Процедуру повторяют дважды. Осадок сушат в вакууме и количественно переносят во внешнюю камеру диффузионного сосуда Конвея. В центральную часть ячейки помещают 1 мл 0,02 М H_2SO_4. Быстро и осторожно к осадку белка прибавляют 1 мл насыщенного раствора тетрабората натрия, подщелаченного до pH 10,5 2 М NaOH. Крышка сосуда должа быть герметично закрыта с дополнительным грузом сверху. Процесс диффузии проходит в течение ночи при комнатной температуре. Содержимое центральной ячейки переносят количественно в колбу и разбавляют водой до определенного объема. Определяют аммиак реакцией с нингидрином фотометрическим методом.

Амидный азот в белке. Инкубируют 2 мг белка в 1 мл 2 М HCl при 100 °С 2—8 ч; охлаждают и в случае необходимости центрифугируют. Переносят 100—250 мкл раствора во внешнюю камеру сосуда Конвея, как в контрольном опыте, но используют более концентрированный боратный буфер (15 мг борной кислоты в 100 мл 2 М NaOH). На каждое измерение требуется ~0,2 мкмоль NH_3. Строят график зависимости количества выделившегося NH_3 от времени и определяют величину отрезка, отсекаемого при экстраполяции к нулевому времени.

8.8.1.2. Диффузионный метод с тринитробензолсульфокислотой [*399*].

Реагенты.

2,4,6-Тринитробензолсульфокислота (ТНБС) перекристаллизована из 1 *М* HCl в воде [110].

Раствор ТНБС (1,1 *М*; 100 мг/200 мл воды) используют свежеприготовленный. Хранят замороженным в темноте.

Сульфат аммония («для анализа», фирма Merck) сушат 3 ч при 100 °С и хранят в эксикаторе над силикагелем.

Борная кислота, 0,1%-ный раствор (масс./об.).

$Na_2B_4O_7$, насыщенный водный раствор.

А. 0,1 *М* Na_2SO_3; готовится ежедневно.

Б. 0,1 *М* NaH_2PO_4.

В. 0,1 *М* $Na_2B_4O_7$ в 0,1 *М* NaOH.

Г. 1,5 мл *А*+98,5 мл *Б* (готовится ежедневно).

Методика. Гидролизуют белок 10 *М* HCl при 37 °С 10 сут. Гидролизат помещают во внешнюю камеру диффузионного сосуда Конвея и добавляют воду, чтобы общий объем составил 1,5 мл. В центральную ячейку наливают 0,9 мл 0,1%-ной борной кислоты. Наносят смазку на крышку камеры, слегка приподнимают ее и быстро добавляют 3 мл насыщенного раствора тетрабората натрия, подщелаченного до pH 10,5 2 *М* NaOH. Плотно закрывают камеру и сверху крышки кладут груз. Реакционную смесь оставляют на 20 ч при комнатной температуре, затем количественно переносят содержимое центральной ячейки во взвешенную пробирку и добавлением воды доводят массу раствора до 1,5 г. Из такого объема можно взять три пробы для анализа по методике Филдса [110], описанной ниже; чувствительность 6 нмоль. Одновременно находят содержание воды и сульфата аммония.

Методика Филдса. Образец вносят в 0,5 мл реагента *В* и доводят объем до 1,0 мл. Добавляют 0,02 мл раствора ТНБС и быстро перемешивают. Через 5 мин останавливают реакцию, приливая 2 мл раствора *Г*. Измеряют поглощение при 420 нм.

	ε_M
ТНФ-α-аминогруппы	22 000
ТНФ-ε-аминогруппы	15 200
ТНФ-тиолгруппы	2250

8.8.1.3. Аминокислотный анализатор [173]. Гидролизуют 2—3 мг белка в 1 мл иодоводородной кислоты (кипящей при постоянной температуре; содержащей 0,03% гипофосфорной кислоты) (BDH-MAR); гидролиз проводят в запаянной вакуумированной ампуле при 107 °С (термостат с принудительной циркуляцией воздуха) в течение 1,5 ч для растворимого и 2 ч для нерастворимого белка. Можно использовать и другие условия: 2 мл 2 *М* HCl, 110 °С, 2 и 14 ч. Гидролизат разбавляют 5 мл 0,1 *М* HCl и наносят на колонку (75×9 мм) со смолой аминекс А-5 аминокислотного анализатора фирмы Beckman. Реальное количество аммиака, образовавшегося из амидных групп, определяют вычитанием из полученной величины пика соответствующих значений, найденных в глухом (без гидролиза белка) эксперименте.

Таким образом с использованием 1,5 мг белка для гидролиза и 2,5 мг для контрольного опыта был определен единственный остаток амида дикарбоновой аминокислоты в белке с молекулярной массой 7000. Гидролиз иодоводородной кислотой и микрометод Кьельдаля дали сравнимые результаты. Аналитическая колонка должна иметь сверху слой смолы в 1 см, расположенный на тефлоновой прокладке для задерживания негидролизованного белка. Эта часть смолы (с прокладкой) удаляется перед подачей на колонку раствора NaOH и затем регенерируется нагреванием при 70 °С с 12 *М* серной кислотой.

8.8.1.4. Бис(1,1-трифтороацетокси)иодобензол [345].

Реагент

Бис(1,1-трифтороацетокси)иодобензол (БТИ) может быть приготовлен по методике, описанной в работе [287]. Растворяют при слабом нагревании 5,0 г фенилиодозилацетата (фирма Aldrich) в 25 мл безводной ТФУ и оставляют стоять при комнатной температуре 1 ч. Растворитель удаляют в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из смеси гексан-ТФУ. Температура плавления 123—126 °С. Хранят в темной склянке при —20 °С.

Методика. Разрушение карбоксиамидных групп. Раствор 200 мкг белка в 2 мл 0,01 М ТФУ или 5 М гуанидин·HCl — 0,01 М ТФУ смешивают с 2 мл свежеприготовленного БТИ в диметилформамиде (36 мг/мл). Ампулу вакуумируют и запаивают; нагревают при различных температурах (35, 60 и 110 °С) в течение увеличивающихся периодов времени (4 и 18 ч). Удаляют избыток реагентов диализом против воды (мембрана типа **Spectrapor 3**). Экстрагируют диализованный образец три раза равным объемом *н*-бутилацетата. Лиофилизуют. Гидролизуют 6 М HCl в вакууме при 110 °С 24 ч.

Аспарагин превращается количественно в 2,3-диаминопропионовую кислоту, а глутамин — в 2,4-диаминомасляную кислоту. Эти кислоты обычно не отделяются от лизина на аминокислотном анализаторе, поэтому содержание амидов в белке определяется дифференциальным методом, т. е. находят содержание Asp и Glu в образцах без обработки белка БТИ и после такой обработки. Некоторые аминокислоты (Cys, His, Lys, Met и Thr) затрагиваются при реакции с БТИ.

8.8.1.5. Ферментативный гидролиз и газожидкостная хроматография [150].

Ферментативный гидролиз. 0,2 мкмоль пептида в 0,2 мл 0,05 М NH_4HCO_3 (pH 8,0) гидролизуют проназой (1% по массе) 24 ч при 37 °С. Затем продолжают гидролиз еще 17 ч, добавив 4% (по массе) аминопептидазы М. Лиофилизуют.

Газожидкостная хроматография. Смесь аминокислот в сосуде с завинчивающейся пробкой с тефлоновым вкладышем обрабатывают 0,2 мл 1,25 М HCl в *н*-бутаноле при 100 °С в течение 7 мин. Реакционную смесь охлаждают во льду и сушат в потоке азота. Затем проводят ацилирование, для этого к остатку добавляют 0,1 мл трифтороуксусного ангидрида в метиленхлориде (1 : 3) и нагревают смесь 20 мин при 100 °С. Производные аминокислот разделяют на колонке (1,5 м×4 мм) с хромосорбом G. В качестве внутреннего стандарта используют *н*-бутилстеарат, содержащий 0,325% (по массе) этиленгликольадипата. Приведенные условия этерификации должны строго соблюдаться во избежание возможного частичного превращения амидов в аспарагиновую и глутаминовую кислоты.

8.9. Серусодержащие аминокислоты

8.9.1. Методы определения

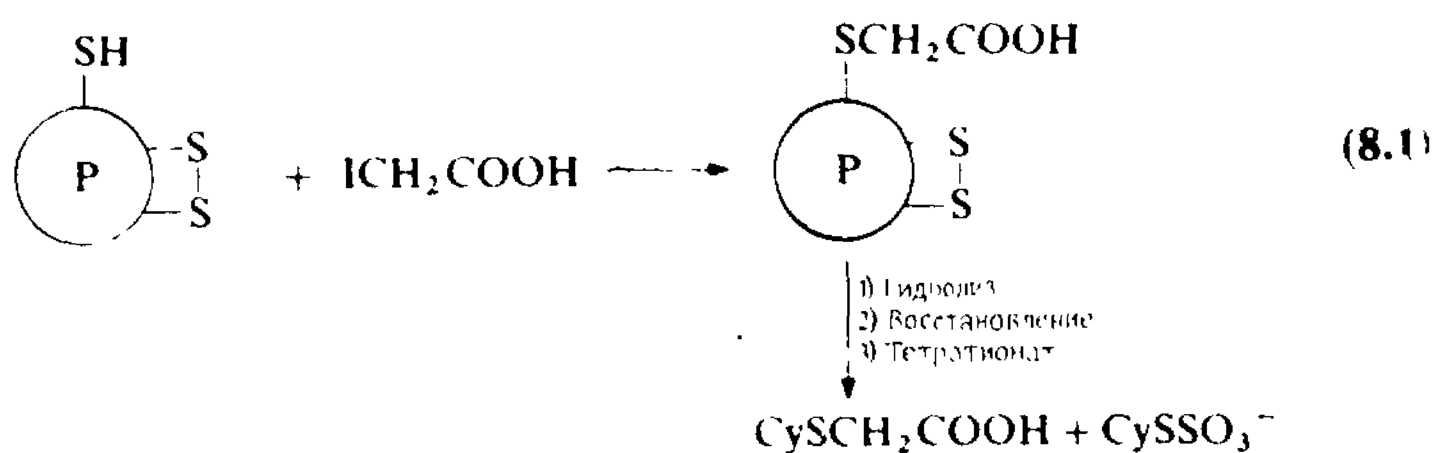
8.9.1.1. Цистеин и цистин. По методике, описанной в работе [262] определяется сумма остатков цистеина и цистина в виде цистеиновой кислоты и метионин в виде сульфона. Можно проводить анализ углеводсодержащих образцов, некоторые аминокислоты (His, Trp и Tyr) при этом разрушаются [162].

Реагенты. Надмуравьиная кислота. К 9 мл 88%-ной муравьиной кислоты добавляют 1 мл 30%-ного H_2O_2. Смесь оставляют на 1 ч при комнатной температуре, затем охлаждают до 0 °С.

Раствор стандартов. Растворяют 20 мг цистина, 30 мг метионина и 20 мг аланина в 2 мл 1 М NaOH и доводят объем до 10 мл. Для анализа используют 10 мкл раствора.

Методика. К белку (содержащему около 0,1 мг цистина) в пробирке из пирекса приливают 2 мл раствора надмуравьиной кислоты и оставляют при 0 °C на 4 ч (для растворимого белка) или на ночь (для нерастворимого). Затем добавляют 0,3 мл 48%-ного HBr при встряхивании пробирки. Смесь испаряют досуха при 40 °C на роторном испарителе. Гидролизуют образец белка в 3 мл 6 М HCl в вакууме при 110 °C 18 ч; высушивают и анализируют с помощью ионообменной хроматографии. Выход метионинсульфона 100±2%, цистеиновой кислоты 94±2%. Число остатков полуцистин+цистеин, а также метионина лучше вычислять по отношению к молярным количествам стабильных в этих условиях аминокислот (Ala, Leu, Asp и Glu).

8.9.1.2. Определение сульфгидрильных групп и остатков полуцистинов. В основе метода определения как свободных сульфгидрильных групп, так и остатков полуцистинов в белке [343] лежит реакция, схематически изображенная с помощью уравнения (8.1).

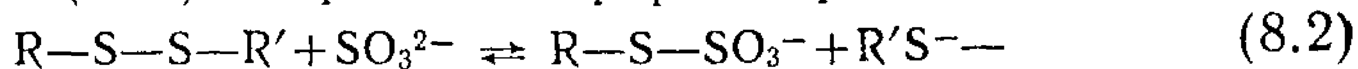


Определение свободных SH-групп. Растворяют белок (0,3 мкмоль) в 0,1 М трис — HCl-буфере, (pH 8,3), содержащем 1 мМ ЭДТА, при 4 °C в отсутствие или присутствии 6 М гуанидин·HCl и ДТТ (0,1 мл, 10 мкмоль) и добавляют 10-кратный мольный избыток перекристаллизованной иодоуксусной кислоты (ICH_2COOH). Может быть использован калийфосфатный буфер (pH 6,7). Гидролизуют 4 М метансульфокислотой (разд. 8.7.2). Определяют карбоксиметилцистеин на аминокислотном анализаторе.

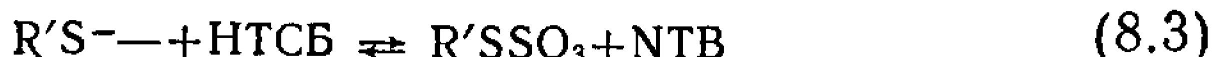
Определение остатков полуцистина. Охлаждают 1 мл раствора гидролизата белка и добавляют к нему 0,3 мл пиридина (перегнанного над нингидрином), 0,9 мл 4 М NaOH (до pH 6,8) и затем ДТТ (4 мкл в 1 мл воды). Продувают азотом, закрывают пленкой парафильм и инкубируют при 37 °C 1 ч. По окончании восстановления добавляют твердый тетратионат натрия (60 мг, 200 мкмоль) и оставляют при 25° не менее чем на 5 ч для превращения всех остатков цистеина в S-сульфоцистеины. Реакционную смесь упаривают на роторном испарителе в вакууме при 30 °C. Осадок после упаривания растворяют в 0,5 мл воды и вновь сушат досуха (для удаления пиридина). Растворяют остаток в буфере с pH 2,2, фильтруют и определяют S-сульфоцистеин на аминокислотном анализаторе.

8.9.1.3. Определение дисульфидных связей. Описываемая ниже методика [365] более удобна, чем предыдущие, и позволяет проводить анализ с более высокой чувствительностью (10^{-8} моль дисульфида) и скоростью. Ошибка определения составляет ±3%.

Дисульфидная связь расщепляется избытком сульфита натрия [уравнение (8.2)]. Образовавшиеся тиоловые группы вступают в реакцию с 2-нитро-5-тиосульфобензойной кислотой (НТСБ) [уравнение (8.3)] и переводятся в сульфопроизводные; эквимолярное количество выделившейся 2-нитро-5-тиобензойной кислоты (НТБ) измеряется спектрофотометрически ($\varepsilon_{412\ нм}$=13 600).

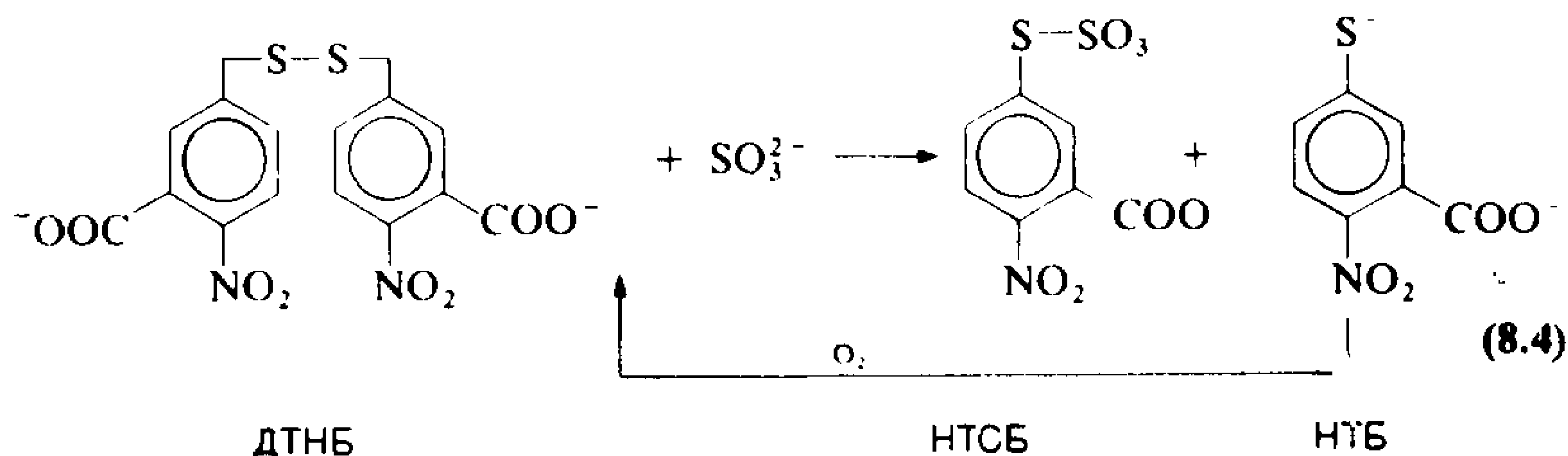


$$R—S—S—R' + SO_3^{2-} \rightleftharpoons R—S—SO_3^- + R'S^- \qquad (8.2)$$



$$R'S^{-}\text{—}+\text{НТСБ} \rightleftharpoons R'SSO_3+\text{NTB} \qquad (8.3)$$

Приготовление реагента. Исходный реагент НТСБ получают в виде 0,5 мМ раствора по уравнению (8.4). Растворяют 0,1 г ($2{,}5\cdot10^{-4}$ моль) 5,5′-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ) (реагент Эллмана; фирма



Aldrich) в 10,0 мл 1 *М* Na_2SO_3 ($1\cdot10^{-2}$ моль) при 38 °С и доводят pH до 7,5. Продувают через раствор кислород, контролируя ход реакции по увеличению содержания НТБ измерением поглощения при 412 нм (концентрация НТБ достигает максимума — 99% — через ~45 мин). Раствор НТСБ хранят при —20 °С, он стабилен в течение 6 месяцев; используется без очистки.

Раствор НТСБ для анализа. Исходный реагент НТСБ разбавляют в 100 раз раствором, содержащим 0,2 *М* трис (основание), свежеприготовленный 0,1 *М* $Na_2S_2O_3$, 3 мМ ЭДТА и 2—3 *М* гуанидинтиоцианата (фирма Eastman); доводят pH смеси до 9,5 с помощью HCl. Раствор стабилен в течение двух недель при комнатной температуре.

Анализ дисульфидов. К 3 мл раствора НТСБ для анализа добавляют по каплям из пипетки 0,01—0,20 мл раствора пептида или белка (с концентрацией S=S-связей 0,5—2 мМ). Смесь инкубируют в темноте в течение 5 мин (пептид) и 25 мин (белок). Измеряют поглощение при 412 нм против холостого опыта (3 мл раствора НТСБ для анализа в соответствующем объеме воды).

Замечание. Гуанидин применяют для денатурации белка, приводящей к большей доступности дисульфидных связей. Мочевину нельзя использовать для этих целей, поскольку присутствующий в ней цианат аммония реагирует с тиольными группами. Последовательные операции по расщеплению дисульфидных связей и титрованию тиольных групп проводят в одном и том же реакционном сосуде, поэтому нет необходимости в удалении растворенного кислорода. Метод можно применять в пептидном картировании для селективной идентификации цистиновых и цистеиновых остатков с последующим их выделением. НТБ-анион претерпевает фотохимическое превращение, продукт которого уже не поглощает при 412 нм [88], поэтому инкубирование должно проводиться в темноте.

Реагент Эллмана был предложен для прямого титрования свободных тиольных групп в белках [105]; позднее эта реакция была изучена более подробно [312].

8.9.1.4. Определение S-сульфиноаланина и цистеиновой кислоты методом ВЭЖХ [171]. S-Сульфиноаланин (сульфиновая кислота L-цистеина (Csa) и цистеиновая кислота (Cya) (как и О-фосфосерин) элюируются совместно в диапазоне нескольких минут на катионообменной колонке; однако они хорошо разделяются на сильноосновной анионообменной смоле (ISA-07/S2504. (фирма Schimadsu) при элюировании 0,05 *М* KH_2PO_4. Времена удерживания: Csa 22 мин, Cya 35 мин, Ser(P) 41 мин.

Для идентификации этих аминокислот можно использовать обработку (после их выхода с колонки) реагентом ОФА+меркаптоэтанол (разд. 8.16.3.1),

для образующихся производных существует линейная зависимость площади пика флуоресценции от выхода: для Csa в интервале 20 пмоль — 5 нмоль и для Cya в интервале 10 пмоль — 5 нмоль.

8.9.1.5. Определение сульфгидрильных групп с п-хлоромеркурибензоатом. Органические ртутьсодержащие соединения, впервые предложенные в 1937 г [152], до сих пор остаются наиболее специфичными и чувствительными реагентами на сульфгидрильные группы в интактных белках. Ниже описывается метод Бойера [37].

Реагент

п-Хлоромеркурибензоат. Для очистки реагент растворяют в 1 М NaOH и, если необходимо, центрифугируют. Добавляют 1 М HCl до выпадения осадка, повторяют переосаждение дважды. Осадок промывают 3 раза дистиллированной водой. Сушат в тонком слое в вакууме над P_2O_5. Растворяют в разбавленном ацетатном или фосфатном буфере (pH 7—8).

Методика. Раствор белка подкисляют до pH 4,6 и добавляют реагент (10-кратный молярный избыток на каждую SH-группу) в разбавленном нейтральном или слегка щелочном растворе при комнатной температуре. Строят график зависимости увеличения поглощения при 232 нм от времени. Находят суммарное увеличение поглощения.

Замечание. Растворы *п*-хлоромеркурибензоата при хранении в течение нескольких дней частично разлагаются. Контролируют растворы (если необходимо после центрифугирования) путем измерения поглощения при 232 нм, pH 7 ($\varepsilon_M = 1{,}69 \cdot 10^4$) или 234 нм, pH 4,6 ($\varepsilon_M = 1{,}74 \cdot 10^4$). В присутствии ЭДТА получают завышенные результаты.

8.9.1.6. Определение метионина и метионинсульфоксида. В процессе расщепления периодатом углеводной цепи в гликопротеинах [69, 95] и дисульфидных связей в белках, а также окисления остатков цистеина надмуравьиной кислотой [162] метионин превращается в метионинсульфоксид [411] и метионинсульфон. Образование метионинсульфооксида происходит в значительной степени даже при использовании низкой концентрации (5 ммоль/л) периодата; при кислотном гидролизе из него вновь образуется метионин, метилсульфониевая соль метионина, гомоцистеин и гомоцистеиновая кислота [112]. Метионинсульфон стабилен в условиях кислотного гидролиза и может быть количественно определен на аминокислотном анализаторе [116, 251]. Для анализа метионинсульфоксида используют щелочной гидролиз или его количество находят непрямым путем — в виде метионинсульфона [275].

8.10. Аргинин

8.10.1. Методы определения

8.10.1.1. Аргинин в интактном белке [366].

Реагенты

А. 0,1% α-нафтол в 50%-ном этаноле (готовится ежедневно).

Б. 10%-ный KOH.

В. 5%-ная мочевина.

Г. Раствор гипобромита калия (0,64 мл Br_2 в 100 мл 5%-ного KOH; готовится ежедневно).

Д. Исходный раствор аргинина, 1,0 мкмоль/мл.

Методика. Аргинин может быть свободным или связанным в белке. К 1 мл испытуемого раствора, содержащего 0,1—1,0 мкмоль аргинина, последовательно добавляют по 1 мл реагентов *А*, *Б* и *В*. Тщательно перемешивают и быстро приливают при непрерывном встряхивании 2 мл раствора *Г* (*важная стадия!*). Одновременно в глухом опыте проделывают ту же последо-

вательность операций с 1 мл воды вместо раствора аргинина. Оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем измеряют поглощение при 520 нм. Определяют концентрацию по градуировочному графику в интервале 0,1—1,0 мкмоль/мл.

8.10.1.2. Определение с п-нитрофенилглиоксалем [410].

Реагенты

А. 0,1 М пирофосфат натрия+0,15 М аскорбат натрия, pH 9,0. Готовится ежедневно с использованием воды, не содержащей азота.

Б. *п*-Нитрофенилглиоксаль (10%-ный раствор, масс./об.) в метаноле. Готовится ежедневно.

В. Субтилизин (0,1%-ный раствор, масс./об.) в 0,01 М фосфате натрия, pH 7,9.

Г. Бычий трипсин (0,1%-ный раствор, масс./об.) в 1,0 мМ HCl+20 мМ $CaCl_2$.

п-Нитрофенилглиоксаль готовят из *п*-нитроацетофенона по методике, описанной в работе [355]. Кипятят в течение 1 ч раствор 39 г (0,30 моль) селеновой кислоты в 24 мл воды, 150 мл ледяной уксусной кислоты и 49,8 г (0,30 моль) *п*-нитроацетофенона. Охлаждают, выпавший селен отфильтровывают. При перегонке сначала удаляется вода и уксусная кислота (при 15 мм рт. ст.), а затем продукт реакции при 118—128 °C (0,6 мм рт. ст.). При стоянии желтая вязкая жидкость превращается в твердую стеклообразную массу с температурой плавления 37—46 °C. Выход 0,15 моль.

Методика. К 0,20 мл раствора образца белка (1—2 мг), содержащего 0,1—1 мкмоль аргинина, в деионизованной воде или 0,1 М пирофосфате натрия (pH 9,0) добавляют по 40 мкл реагентов *В* и *Г*. Инкубируют при 37 °C 3 ч. Охлаждают и разбавляют до 3,0 мл буфером *А*. Добавляют при размешивании 25 мкл реагента *Б* и инкубируют при 30 °C 30 мин. Охлаждают ниже 20 °C в ледяной бане и измеряют поглощение при 475 нм против «холостого» образца. Содержание аргинина находят по градуировочному графику, построенному с применением раствора аргинина известной концентрации (в диапазоне 0,03—0,33 ммоль/л L-аргинина в 3 мл реагента *А*) +25 мкл реагента *Б*; для аргинина $\varepsilon_{475}=0,715$.

8.11. Фосфорилированные аминокислоты

Фосфоэфирные связи в О-фосфо-производных серина, треонина и тирозина разрушаются под действием сильных кислот, поэтому для предотвращения деградации этих производных нужно использовать короткое время гидролиза [322]. Лабильностью в кислых условиях объясняется и отсутствие надежного количественного метода определения фосфоаминокислот в белках. Обнаружение аминокислот, содержащих радиоактивную метку [^{32}P], осуществляют авторадиографией или измерением радиоактивности с помощью счетчика.

Фосфорилированные пептиды могут быть отделены от нефосфорилированных и фракционированы с помощью ВЭЖХ в изократических условиях при 22 °C на колонке сферисорб C_{18} с фосфатным буфером pH 3,2—4,5 и *н*-гексансульфокислотой в качестве противоиона [114]. Около 0,1 нмоль пептида может быть идентифицировано по поглощению при 210 нм, использование флуоресцентной или радиоактивной метки [^{32}P] позволяет повысить чувствительность в 100 раз.

8.11.1. Гидролиз белка

Белок обрабатывают 6 М HCl при 110 °C в течение 1—4 ч. Гидролизат фильтруют через фильтр типа Millipore (0,22 мкм) и удаляют HCl в вакууме.

Остаток растворяют в 0,001 М ТФУ, добавляют в качестве стандартов немеченые аминокислоты [51].

Фосфогистоны (100 мкг) гидролизуют с помощью 6 М HCl в вакууме при 100 °C в течение 4 ч или инкубированием со 100 мкг протеазы из *S. griseus* в 50 мМ трис — HCl-буфере (pH 7,5) при 20—24 °C в течение 20 ч [358].

Ферментативный гидролиз [^{32}P] *фосфопротеинов.* Растворяют белок в 100 мкл 0,1 М аммонийбикарбоната, содержащего 2 мМ ЭДТА (нейтрализованной) и 250 нмоль каждой немеченой фосфоаминокислоты Ser(P), Thr(P), Tyr(P). Добавляют трипсин (200 мкг/мл) и инкубируют 12 ч при 37 °C в присутствии ЭДТА, которая ингибирует любую фосфатазную активность, внесенную с протеазой. Затем добавляют аминопептидазу М (200 мЕ) и инкубируют еще 12 ч при 37 °C (*J. Downward*, 1984, частное сообщение).

8.11.2. Методы анализа

8.11.2.1. Тонкослойная хроматография.

1. На пластинках со слоем целлюлозы MN-300. Элюэнт: бутанол — изопропанол — муравьиная кислота — вода (3 : 1 : 1 : 1) ([358], детали не приведены).

2. На полиамидных пластинках (фирма Cheng-Chin). В одном направлении хроматографируют в 5%-ной пропионовой кислоте, содержащей 0,013—0,025% ДСН. Высушивают и опрыскивают 0,2%-ным раствором нингидрина, нагревают в термостате при 50 °C под наблюдением. Thr(P) и Ser(P) мигрируют вместе, R_f=0,70; Tyr(P) R_f=0,54.

8.11.2.2. Электрофорез [42, 169]. Буфер pH 1,9: ледяная уксусная кислота — муравьиная кислота (88%-ная) — вода (78 : 25 : : 897); буфер pH 3,5: ледяная уксусная кислота — пиридин — вода (50 : 5 : 945). Пиридин очищают 18-часовым кипячением над *п*-толуолсульфохлоридом и затем перегоняют.

Используют тонкослойные пластинки (фирма Brinkman, Polygram CEL MN-300, 200×200 мм, 0,1 мм). Растворяют образец в буфере pH 1,9 и проводят электрофорез при pH 1,9, 1,5 кВ, 75 мин по направлению к аноду. После высушивания проводят электрофорез во втором направлении в буфере pH 3,5, 1 кВ, 1 ч. Сушат пластинку, опрыскивают буферным раствором, содержащим 0,1% нингидрина (разд. 8.14.2). Tyr(P) дает серое окрашивание; Ser(P) и Thr(P) — голубое. В случае радиоактивных препаратов используют авторадиографию.

Стандартные растворы: смесь по 0,5 мкл растворов нейтрализованных фосфоаминокислот (20 мг/мл). На рис. 8.2 показано положение пятен фосфоаминокислот после двумерного электрофореза.

8.11.2.3. Аминокислотный анализатор [51]. Используют короткую колонку (по Муру и Стейну) (80×6,0 мм), упакованную смолой фирмы Durrum DC6A. Растворяют образец в 0,01 М ТФУ с немечеными стандартами фосфоаминокислот (1,5 нмоль каждой) или без них и наносят на колонку. Элюирование

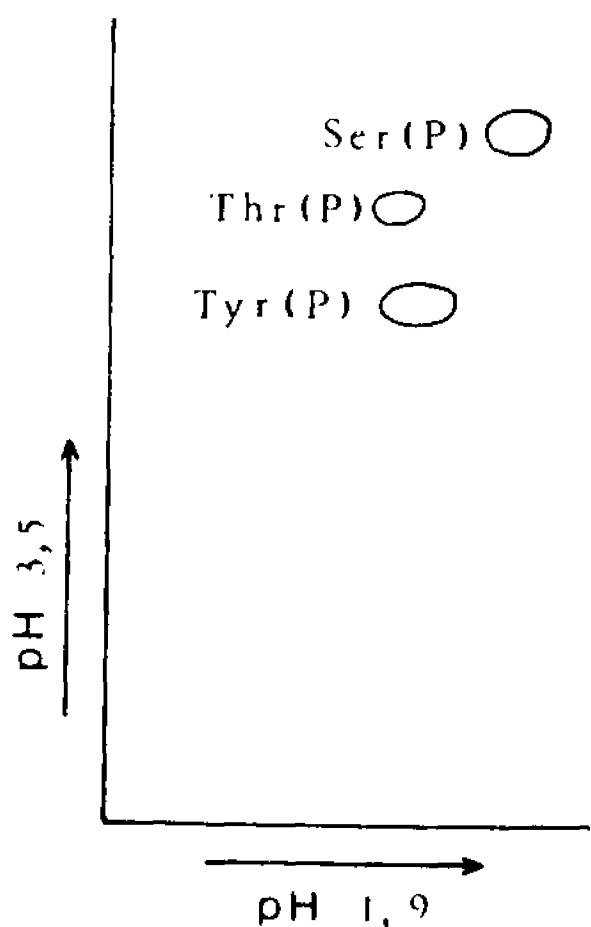


РИС. 8.2. Двумерное разделение электрофорезом фосфоаминокислот: в первом направлении при pH 1,9, во втором направлении при pH 3,5 [43].

в изократическом режиме при 50 °C 0,01 М ТФУ со скоростью потока 0,4 мл/мин. При флуориметрическом определении фракции обрабатывают ОФА-реагентом (разд. 8.16.3.2) (скорость потока 0,2 мл/мин) в специальном смесителе. При работе с [^{32}P] меченным образцом ОФА-реагент заменяют на воду и собирают фракции по 1 мл для измерения радиоактивности.

Приблизительные величины времен удерживания: Ser(P) 19 мин Thr(P) 28 мин, Tyr(P) 64 мин. Цистеиновая кислота выходит в свободном объеме, другие аминокислоты не элюируются.

Регенерируют колонку, пропуская через нее следующие растворы:

1) 1,0 М по Na^+ (34,8 г NaCl+39,2 г тринатриевой соли лимонной кислоты на 1 л воды с добавлением 1 мл фенола для подавления роста бактерий);

2) 0,2 М NaOH;

3) 1 М ТФУ;

4) 0,01 М ТФУ.

Результаты количественного анализа. Выходы для стандартных образцов фосфоаминокислот (по измерению флуоресценции) составили: Ser(P) 88%, Tyr(P) 71% относительно выхода Thr(P), принятого за 100%, и соответственно Thr(P) 89%, Ser(P) 71% и Tyr(P) 71% относительно выходов их нефосфорилированных аналогов.

8.11.2.4. Жидкостная хроматография под высоким давлением.

1. Анионообменная колонка (фирма Ultrasil Ax, 250×4,6 мм, Beckman), уравновешенная 15 мМ К-фосфатным буфером (pH 3,8). Наносят образец и элюируют тем же буфером в течение 25 мин, скорость потока 2,0 мл/мин. Нерадиоактивные соединения детектируют измерением поглощения при 206 нм. Приблизительные времена удерживания: Thr(P) 6 мин; Ser(P) 8,6 мин; Tyr(P) 9 мин и P_i 10,5 мин [358].

2. Анионообменная колонка (Synchrom Ax-300, 250×4,6 мм). Элюирование фосфатным буфером (как и в пункте 1), скорость потока 1 мл/мин. Фракции элюата обрабатывают ОФА [213] и измеряют поглощение при 338 нм или радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Времена удерживания: Thr(P) 12 мин; Ser(P) 17 мин; Tyr(P) 23 мин (*J. Downward*, частное сообщение).

3. Колонка (250×4,6 мм) с анионообменной смолой Partisil-10 SAX (фирма Whatwan). Наносят образец и элюируют 10 мМ К-фосфатным буфером (pH 3,0), содержащим 10,5% метанола, скорость потока 1 мл/мин, температура комнатная. Обнаружение с помощью обработки ОФА. Приблизительные времена удерживания: Thr(P) 26 мин; Tyr(P) 32 мин; Ser(P) 38 мин; P_i 60 мин [413].

4. Дансилирование и ВЭЖХ ДНС-фосфоаминокислот [77]. Гидролизуют белок 2 ч при 110 °C концентрированной соляной кислотой (фирма Pierce). Упаривают в потоке азота. Приливают 100 мкл 0,2 М Na_2CO_3 и снова упа-

ривают. Суспендируют образец в 100 мкл воды и добавляют 100 мкл свежеприготовленного раствора дансилхлорида (2,5 мг ДНС-Cl на 1 мл ацетона). Инкубируют в темноте 1 ч при 37 °C. Высушивают досуха в потоке азота. Для анализа методом ВЭЖХ растворяют ДНС-производные в 100 мкл 0,5%-ной ТФУ.

ВЭЖХ на колонке Protesil 300 (фирма Whatman). Промывают колонку раствором вода — ТФУ (1000 : 1) или смесью вода — ацетонитрил — ТФУ (970 : 30 : 1). Элюируют в режиме линейного градиента: 30 мл раствора вода — ацетонитрил — ТФУ (970 : 30 : 1) + 30 мл раствора вода — ацетонитрил — ТФУ (900 : 100 : 1). Измеряют поглощение элюата при 280 нм. Собирают радиоактивные фракции для измерения на счетчике. Приблизительные времена удерживания: Ser(P) 12 мин, Thr(P) 16 мин и Tyr(P) 22 мин.

ВЭЖХ на микроколонке Bondapak C_{18} (фирма Waters). Элюирование в изократическом режиме раствором вода — ацетонитрил — ТФУ (925 : 75 : 1). Приблизительные времена удерживания: Ser(P) 15 мин, Thr(P) 22 мин, Tyr(P) в элюате не обнаружен.

5. Ионопарная ВЭЖХ фосфоаминокислот на обращенной фазе [1, 268]. Колонка (150 м×4,6 мм) с Partisil 5 ODS2. Элюируют при комнатной температуре смесью 0,5 мМ гидроксид тетрабутиламмония — 0,5 мМ *о*-фталат, pH 6,3, скорость потока 1 мл/мин. Детекция при 243 нм, шкала на 0,1 ед. опт. пл., чувствительность 200 пмоль. Приблизительные времена удерживания: Asp и Glu 5,3 мин; P_i 6,9 мин; Thr(P) 11,6 мин; Ser(P) 12,8 мин; Tyr(P) 15,9 мин.

8.12. γ-Карбоксиглутаминовая кислота

Впервые γ-карбоксиглутаминовая кислота Gla была обнаружена в протромбине, позже — в других белках и моче; для ее количественного определения были предложены различные методы: аминокислотный анализ [134, 145, 146, 179, 182, 234, 361], ГЖХ [247], колориметрический анализ (в интервале $0{,}5\cdot10^{-4}\div5\times\times10^{-4}$ моль/л) [290] и ВЭЖХ [205, 206].

Gla полностью декарбоксилируется в условиях кислотного (1 М HCl, 100 °C, 16 ч, вакуум) и щелочного гидролиза, используемого для белков [205]. Пептиды, содержащие остатки Gla, могут быть обнаружены с помощью так называемого «теплового диагонального» метода. Пептидная смесь подвергается электрофорезу на бумаге при pH 6,5. Бумагу высушивают нагреванием до 80 °C в течение 1 ч и затем проводят электрофорез при pH 6,5 во втором направлении. Декарбоксилированные пептиды сдвигаются при этом с диагонали [235] (а также *H. Morris*, частное сообщение).

8.12.1. Гидролиз белка

1. Гидролизуют белок в 2,5 М KOH при 100 °C (16 ч, вакуум или N_2). Центрифугируют. Охлаждают супернатант в ледяной бане и подкисляют до pH 4—5 добавлением по каплям сначала 60%-ной, а затем 6%-ной $HClO_4$. Оставляют во льду на 30 мин. Центрифугируют для удаления осадка $KClO_4$. Для анализа используют 2—10 мкл супернатанта [205].

2. Гидролизуют белок в 0,4—1,0 мл 2,0 М KOH при 110 °C в течение 22 ч. Добавляют 0,2 мл свежеприготовленного насыщенного раствора $KHCO_3$.

При перемешивании нейтрализуют 70%-ной $HClO_4$ до pH 7 (по индикаторной бумаге). Центрифугируют и прозрачный супернатант анализируют. Gla стабильна при pH 7 (—20 °C) [145].

8.12.2. Методы анализа

8.12.2.1. Тонкослойная хроматография. На алюминиевых пластинках со слоем целлюлозы 0,1 мм (фирма Merck) в системе *н*-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10) Gla дает фиолетовое пятно при окрашивании нингидрином с R_f 0,24. Описан колориметрический метод определения Gla с ацетальдегидом и нитропруссидом [260].

8.12.2.2. Аминокислотный анализатор.

Катионнообменная колонка. Время выхода Gla с колонки сильно зависит от pH первого буфера. На анализаторе Beckman 121 M при pH цитратного буфера 2,68 времена элюирования составляли 13,0, 17,4 и 30,5 мин соответственно для Cya, таурина и Gla. Другие аминокислоты элюировались позднее. Расчетный коэффициент по нингидрину для Gla составляет 39% от коэффициента для Glu [145]. В буфере pH 3,25 Gla плохо разрешается с пироглутаминовой кислотой. Для их идентификации собирают фракцию элюата и берут две параллельные пробы: первую для щелочного (2,5 M NaOH, 105 °C, 24 ч), вторую для кислотного (6 M HCl, аналогичные условия) гидролиза. Пироглутаминовая кислота в обоих случаях полностью гидролизуется до глутаминовой кислоты. Концентрацию Gla находят из разницы между количеством глутаминовой кислоты, образовавшейся при кислотном и щелочном гидролизах. В качестве внутреннего стандарта при количественном определении используют [^{14}C] цистеиновую кислоту. Суммарный выход Gla в виде Glu составляет 95—98% [179].

Анионообменная колонка. С анионообменной колонки Gla элюируется после всех аминокислот. Так, с колонки (125×9,0 мм, фирма Bio-Rad) с носителем Aminex A-27 или A-28, уравновешенной 0,3 M натрийацетатным буфером (pH 4,6), при элюировании тем же буфером (скорость потока 70 мл/ч, 30 °C) Gla элюировалась на 55-й минуте [361]. Аналогичные результаты были получены в работе [182].

8.12.2.3. ВЭЖХ [206].

Предколоночная модификация. Смешивают 50 мкл гидролизата белка или мочи с 50 мкл ОФА-реагента (разд. 8.16.3.2) и энергично перемешивают. Через 2 мин добавляют 100 мкл 0,1 M KH_2PO_4 в 66%-ном ацетонитриле. 2—20 мкл приготовленного раствора вносят на колонку.

ВЭЖХ. Используют короткую колонку (50×4,6 мм), упакованную Nucleosil 5SB (размер частиц 5 мкм; фирма Macherey-Nagel). Это сильный анионообменник на основе силикагеля с $N(CH_3)_3$-функциональными группами. Элюируют в изократическом режиме при 47 °C (скорость потока 2 мл/мин), в качестве подвижной фазы служит 0,2 M натрийцитратный буфер (pH 5,28) — ацетонитрил (1 : 1). Повторные анализы могут быть проведены в тех же условиях без регенерации колонки. Детектирование осуществляют при длине волны возбуждающего света 240 нм и эмиссии при 418 нм с обрезающим фильтром. Большинство аминокислот элюируются вместе в течение двух минут, затем сходят с колонки Glu, Asp, Cya, S-карбоксиметилцистеин и, наконец, Gla (на 7-й минуте). Соотношение площадь пика: количество Gla линейно меняется в диапазоне 0,3—100 пмоль.

Замечание. Недавно производное Gla с ОФА было определено методом ВЭЖХ с использованием β-карбоксиаспарагиновой кислоты в качестве внутреннего стандарта [143].

8.13. Ацетильная и формильная группы

После первого сообщения о выделении N-ацетилированного пептида из N-концевого участка белка вируса табачной мозаики [273] обнаружено значительное число белков с блокированными α-аминогруппами. N-Ацетилированные остатки аланина, аспарагиновой кислоты, глицина, серина, треонина идентифицированы у белков, выделенных из различных источников [47, 81]; см. также обзоры [2 и 406].

С N-формилметионина начинается синтез белковой цепи на рибосоме, формилвалин и формилглицин расположены на N-конце у грамицидина A [325] и меллитина [203]. Описано спонтанное N-формилирование формальдегидом остатков L-лизина [371].

Для установления природы ацилирующего остатка в белках применялись различные методы. Так, ацетильная группа определялась с помощью ферментативных методов [135, 201, 204, 319, 346, 354], колориметрически в виде комплекса с гидроксаматом железа [227], перегонкой с паром с последующим титрованием [7, 183], идентифицировалась в форме ацетогидразида и 1-ацетил-2-ДНФ-гидразида [301] или 1-ацетил-2-дансилгидразида [329]. Применение ферментативных методов предполагает наличие у исследователя высокоочищенных препаратов соответствующих ферментов и требует, как правило, значительных количеств субстрата (100 нмоль ацетата в образце), хотя описана методика определения ацетата на уровне 3—12 нмоль/мл с флуоресцентной детекцией [135].

Формильная группа определялась колориметрическим методом (по Баркеру и Замерсу) после реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, приводящей к образованию хромофорной группы с λ_{max}=450 нм (фосфаты и уксусная кислота не мешают определению). Зависимость поглощения от концентрации линейна в диапазоне 1—10 ммоль, но чувствительность определения низкая [113].

Если N-концевой участок белка удается выделить в виде короткого пептида, то содержание в нем ацетилированной аминокислоты может быть определено после гидролиза хроматографическим или электрофоретическим анализом [414]. Для установления природы блокирующего остатка и одновременно аминокислотной последовательности пептида наиболее надежен прямой масс-спектрометрический метод (на анализ требуется ~50 пмоль пептида) (гл. 19), [6].

Разработано несколько методик определения ацетильных групп в белках с помощью ГЖХ [45, 154, 164, 332, 389, 390] и пиролиза [402]. Однако при газожидкостном анализе могут возникать «хвосты» уксусной кислоты на колонке, «фальшивые»

пики, а также наблюдаться низкий ответный сигнал детектора.

Предложено отщеплять ацетильную и формильную группы щелочным гидролизом белка [54], так как при кислотном гидролизе образуются свободные уксусная и муравьиная кислоты и их потери в дальнейшем неизбежны. После щелочного гидролиза соли этих кислот превращаются в фенациловые эфиры при катализе краун-эфирами (дициклогексил-18-краун-6). Для обнаружения фенациловых эфиров пламенно-ионизационным детектором содержание ацильных групп в образце должно быть достаточно высоким (~20 нмоль). До настоящего времени остается проблемой более полное использование чувствительности метода ГЖХ, поскольку в обычных условиях возможна инжекция в колонку лишь небольшой части полученного производного образца. В описываемом случае в колонку вводилось 1—2 нмоль фенацилового эфира. Более эффективны в этом отношении пентафторобензиловые (ПФБ) эфиры, чувствительность определения которых выше благодаря возможности использования детектора электронного захвата.

8.13.1. Определение ацетильных и формильных групп

8.13.1.1. Метод газожидкостной хроматографии [59].

Приборы.

Газожидкостный хроматограф с детектором электронного захвата (или пламенно-ионизационным меньшей чувствительности).

Стеклянная капиллярная колонка (30 м×0,27 мм, внутренний диаметр), покрытая смесью 5% хромосорб R+5% PP Seb (нанесенной по соответствующей методике) [55]. Прямой ввод образца (объем до 2 мкл) в капиллярную колонку без обогрева ввода [56].

Реагенты

α-Бромо-2,3,4,5,6-пентафторотолуол (ПФБ-Br) (фирма Aldrich),

15-краун-эфир (фирма Fluka),

Ацетонитрил (перегнанный над P_2O_5).

Методика. ≥5 нмоль N-ацетилированного соединения гидролизуют в 20 мкл 0,1 М NaOH в полипропиленовой центрифужной пробирке объемом 0,5 мл в автоклаве при давлении в 1 атм (123 °С) в течение 3 ч. По окончании гидролиза вносят определенное количество (~5 нмоль) внутренних стандартов (*н*-масляная и изовалериановая кислоты) и приливают к смеси 20 мкл 1 М HBr и 2 мкл раствора 1 М $NaHCO_3$. Отбирают аликвоты по 5 мкл и высушивают их в силанизированных стеклянных пробирках (50×30 мм) в потоке азота. К сухому остатку добавляют 10 мкл ацетонитрила, содержащего ПФБ-Br (50 нмоль) и 15-краун-5-эфир (50 нмоль). Герметически закрывают пробирку и инкубируют при 80 °С 2 ч, регулярно встряхивая. Отбирают 1 мкл реакционной смеси, разбавляют 2 мл толуола. 1 мкл толуольного раствора наносят на колонку в изократическом режиме при 110 °С без обогрева ввода. Времена удерживания: ПФБ-Br 6 мин, ПФБ-формиат 9 мин, ПФБ-ацетат 11 мин, ПФБ-пропионат 15 мин и нитробензол 18 мин (последний используется как внутренний стандарт).

Поскольку следовые количества уксусной и муравьиной кислот образуются в условиях реакции из реагентов, необходимо провести «глухой» опыт (в отсутствие исследуемого материала). Определяют также содержание ацетата в виде ПФБ-эфира в негидролизованном образце белка. Найденные

величины и степень чистоты препарата белка ограничивают чувствительность метода (чувствительность обнаружения этих соединений с помощью детектора электронного захвата ~3 фмоль).

8.14. Обнаружение соединений при хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента

После высушивания хроматограмму просматривают в УФ-свете для обнаружения флуоресцирующих пятен. Обычно также видна линия фронта растворителей, по ее форме можно проконтролировать нарушение потока в хроматографической системе.

Ниже приводимые методики используются для проявления хроматограммы погружением в раствор реагента или опрыскиванием в соответствующих условиях.

8.14.1. Флуоресцентные методы обнаружения

1. Погружают лист бумаги в раствор флуорескамина в ацетоне (25 мг в 1 л, содержащем 0,5% триэтиламина). Исследуют в УФ-свете, чувствительность обнаружения 1 нмоль пептида. В препаративном опыте применяют менее концентрированный раствор флуорескамина (4 мг/л). После промывки ацетоном могут быть применены другие типы окрашивания.

2. Необходимы: раствор флуорескамина (10 мг/100 мл ацетона) и раствор триэтиламина (1%-ный в ацетоне). Хроматограмму высушивают, для удаления растворителя промывают ацетоном и вновь сушат. Опрыскивают раствором триэтиламина и после сушки в вытяжном шкафу (15 мин) раствором флуорескамина. Высушивают, опрыскивают ацетоном, снова сушат. Отмечают флуоресцирующие пятна под УФ-лампой (336 нм). Для обнаружения слабо проявившихся пятен пептидов процедуру обработки повторяют еще раз. При нагревании хроматограммы в термостате при 110 °С в течение 3 ч могут быть обнаружены пептиды с N-концевым остатком пролина [131].

3. Необходимы: раствор *о*-фталевого альдегида (30 мг/100 мл ацетона) и раствор триэтиламина (1%-ный в ацетоне, содержит 0,05% 2-меркаптоэтанола). Процедура обработки хроматограммы этим реагентом аналогична описанной в пункте 2. По чувствительности ОФА не уступает флуорескамину, но дешевле его.

8.14.2. Обнаружение с помощью нингидрина

Окрашивание нингидрином может быть проведено после обработки флуорескамином. Если в процессе хроматографии использовались кислые растворители, то следует слегка подщелочить реагент слабым основанием, если растворители были щелочными, то рекомендуется подкислить его слабой кислотой.

1. Нингидрин (0,2%-ный раствор в 95%-ном ацетоне) с добавлением нескольких капель коллидина (2,4,6-триметилпиридин) или ледяной уксусной кислоты. После погружения в раствор или опрыскивания сушат хроматограмму при 60 °С, 20 мин или при 100 °С 5—10 мин под наблюдением. Перегрев вызывает образование темного фона, он не возникает, если оставить хроматограмму на 24 ч в темноте при комнатной температуре. Большинство аминокислот дает фиолетовое окрашивание, но имеются исключения (Asp — сине-красное, Pro и Hyp — желтое окрашивание). Предел чувствительности ~1 мкг.

2. Необходимы: нингидрин (300 мг), 3 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл *н*-бутанола. Чувствительность обнаружения 0,001 мкг (для аланина) — 0,1 мкг (для пролина и аспарагиновой кислоты) [107].

3. Необходимы забуференные растворы нингидрина. Нингидрин (300 мг), ледяная уксусная кислота (20 мл) и коллидин (5 мл) разбавляют до объема 100 мл этанолом [190]. Нингидрин (0,1 масс./об.) в смеси ацетон — уксусная кислота — коллидин (100 : 30 : 4) [42].

4. Нингидрин — ацетат кадмия [148]. В отличие от нингидрина этот реагент дает прочное окрашивание (для всех аминокислот — красное, для пролина — желтое), не выцветающее со временем.

Растворяют 0,5 г ацетата кадмия в смеси 50 мл воды и 10 мл концентрированной уксусной кислоты. Доводят до объема 500 мл ацетоном. К порции этого раствора прибавляют твердый нингидрин до конечной концентрации 0,2%. После опрыскивания хроматограмму нагревают 15 мин при 60 °С. Отмечают пятна аминокислот сразу же и через 24 ч хранения при комнатной температуре. Не возникает окрашенного фона, если хроматограмму после обработки реагентом без нагревания оставляют на ночь в темноте при комнатной температуре. У некоторых соединений (таурин, треонин) окраска проявляется очень медленно. Чувствительность обнаружения ~0,5 нмоль.

8.14.3. Смешанные методы обнаружения

Система хлор — крахмал — иод [293]. Этот тест на пептидную связь (можно применять после нингидрина) основан на замещении водорода в NH-группах пептида на хлор.

После хроматографии в пиридиновых буферах обязательна отмывка бумаги ацетоном. Затем помещают лист бумаги в камеру, насыщенную хлором, на несколько минут, в течение этого времени нингидриновая окраска исчезает. После тщательного проветривания хроматограммы от следов хлора (вытяжной шкаф!) погружают ее в смесь (1 : 1) 2%-ного (масс./об.) водного раствора крахмала и 2%-ного (масс. об.) KI. Пептиды проявляются в виде темно-синих пятен на розово-голубом фоне (чем длиннее пептид, тем больше интенсивность окраски).

Аргинин [409].

Реагенты.

А. 0,02%-ный фенантренхинон в безводном этаноле.

Б. 10%-ный NaOH в 60%-ном этаноле.

Методика. Смешивают равные объемы реагентов *А* и *Б* непосредственно перед использованием. Погружают в раствор или опрыскивают им хроматограмму. Высушивают на воздухе 20 мин. Флуоресцентные пятна видны под УФ-светом. Чувствительность определения 10^{-4} мкмоль. Далее могут быть применены последовательно нингидрин и диазореагент Паули.

Аргинин [177].

Реагенты для модифицированной реакции Сакагучи.

А. 0,0125%-ный α-нафтол в абсолютном этаноле. Хранят в течение одной недели на холоду в темной склянке.

Б. 1,5 М NaOCl. Хранят 3—4 мес при 0—4 °С.

В. Раствор иода. 22,4 г иода и 30 г KI растворяют в 400 мл дистиллированной воды. Хранят неограниченное время при комнатной температуре.

Г. 10%-ный NaOH.

Методика. Хроматограмму погружают в реагент *А* и высушивают. Опрыскивают трижды раствором 1,5 мл *А*+23,5 мл *Б* и затем один раз смесью 2,4 мл *В*+20 мл *Г*.

Растворы для окрашивания должны быть использованы в течение 10 мин после смешивания компонентов. Аргинин, аргининсодержащие пептиды и многие соединения гаунидинового ряда образуют красное окрашивание, ста-

бильное в темноте в течение нескольких дней (чувствительность <1 мкг). После такой обработки может быть также применен нингидриновый реагент при условии предварительного подкисления уксусной кислотой для нейтрализации избытка щелочи.

Гистидин и тирозин [44]. *Применение диазореагента Паули.*

Реагенты

А. 0,4 М сульфанилат натрия.

Б. 0,4 М нитрат натрия.

В. 0,25 М HCl.

Г. 1 М карбонат натрия.

Методика. Смешивают реагенты *А*, *Б*, *В* и *Г* в пропорции 1 : 1 : 8 : 10. Реагент специфичен для гистидина, тирозина и некоторых их производных. Гистидин и гистидинсодержащие пептиды дают ярко-красную окраску, тирозин — коричневую.

Тирозин [293]. Хроматограмму погружают в 0,1%-ный (масс./об.) раствор 1-нитрозо-2-нафтола в ацетоне. Высушивают. Затем погружают в смесь ацетон — концентрированная азотная кислота (9 : 1). Высушивают и нагревают осторожно (не перегревая) при 105 °С 2—3 мин. Тирозин дает темно-красное окрашивание. Тест может быть использован после нингидрина.

Триптофан и имидазолы [344]. *Применение реагента Эрлиха. п*-Диметиламинобензальдегид в концентрированной HCl (10%-ный раствор, масс./об.), разбавляют ацетоном (1 : 4) непосредственно перед использованием.

Методика. После опрыскивания оставляют хроматограмму при комнатной температуре. При этом у триптофана и триптофансодержащих пептидов постепенно развивается фиолетовое окрашивание. Тест может быть использован после нингидрина.

Серусодержащие аминокислоты [333].

1. Система азид натрия — иод. Опрыскивают сухую хроматограмму раствором 0,05 М иода в 50%-ном этаноле, содержащем 1,5% азида натрия. Пятна лучше видны в УФ-свете. Чувствительность определения 0,5 мкг метионина.

2. Применение иодида платины. Смешивают в следующем порядке: 4 мл 0,002 М хлорида платины, 0,25 мл 1 М иодида калия, 0,4 мл 2 М HCl и 76 мл ацетона. Погружают в этот раствор или обильно им опрыскивают хроматограмму. Цистеин, цистин, метионин и восстанавливающие агенты дают белые пятна на красно-фиолетовом фоне. Фенолы и лутидины, использованные в системе растворителей, должны быть удалены промывкой хроматограммы эфиром, ацетоном и т. д.

3. Применение нитропруссида натрия.

А. Растворяют нитропруссид натрия (1,5 г) в 5 мл 1 М серной кислоты. Добавляют 95 мл метанола и 10 мл 28%-ного аммиака. Фильтруют и хранят при 0—4 °С.

Б. Растворяют 2 г цианида натрия в 5 мл воды и разбавляют до 100 мл метанолом. Далее:

а) для обнаружения цистеина используют реагент *А*;

б) для обнаружения цистина хроматограмму погружают в реагент *А* или опрыскивают им. Слегка высушивают и во влажном состоянии обрабатывают реагентом *Б*;

в) для обнаружения цистеина и цистина готовят растворы реагентов с двойной концентрацией и обрабатывают хроматограмму смесью равных объемов *А* и *Б*.

Аспарагин [288].

После окрашивания нингидрином хроматограмму погружают в 5%-ный водный раствор бората, промывают водой и высушивают. Аспарагин проявляется в виде голубого пятна.

Аспарагин дает реакцию с нингидрином на хроматографической бумаге, но его идентификация затруднена в тех случаях, когда рядом с ним расположены аргинин, аспарагиновая кислота, глицин, серин или некоторые другие

аминокислоты. Обработка боратом приводит к возникновению голубого окрашивания, характерного только для аспарагина. В высоковольтном электрофорезе при pH 5,8 аспарагин слегка сдвигается к катоду, а аспарагиновая кислота движется к аноду.

Фосфаты (по Шмидту и Таннхаузеру).

Реагенты

Молибдат аммония 1 г (тонко измельченный) растворяют в 8 мл воды.

Концентрированная HCl.

Хлорная кислота, 12 моль/л.

Ацетон.

Реагенты берут в соотношении 8 : 3 : 3 : 86.

Методика. Готовят реагент (смешением указанных объемов компонентов). Погружают в него бумагу и затем высушивают. При освещении УФ-светом (≥30 мин) моно-, ди- и трифосфаты нуклеозидов проявляются в виде голубых пятен.

Сахара [36]. Опрыскивают хроматограмму 6,5 мМ раствором N-(1-нафтил)этилендиаминдигидрохлорида (фирма Baker) в метаноле, содержащем 3% серной кислоты. Нагревают при 100 °С. Цветные пятна (цвет варьирует от коричнево-красного для аскорбиновой кислоты до сине-серого для дезоксиглюкозы) проявляются на белом фоне. Метод может применяться для количественного анализа сахаров.

Применение паров иода. Помещают высушенную бумагу и тонкослойные пластинки в стеклянную камеру, наполненную парами иода. Некоторые производные аминокислот, индолы и другие соединения обнаруживаются по быстрому окрашиванию с образованием темных пятен на бледном фоне.

Другие недеструктивные методы обнаружения см. [12].

Дополнительная литература. С подробностями применения многих локализующих реагентов можно познакомиться в работах [58, 94, 344]. Описано последовательное применение различных реакций на хроматограммах при пептидном картировании [102].

8.15. Тонкослойная хроматография аминокислот

Тонкослойная хроматография (ТСХ) — простейший и наиболее доступный метод разделения аминокислот, но возможности количественной оценки результатов этим методом весьма ограничены. Идентификация индивидуальных пятен может быть сделана только тщательным сравнением хроматограмм, полученных для стандартных аминокислот, разделенных в идентичных условиях параллельно (в то же самое время). Описаны методы приготовления пластинок со слоем силикагеля и целлюлозы и условия разделения аминокислот двумерной хроматографией [44]. Ряд фирм выпускает пастинки для тонкослойной хроматографии, дающие воспроизводимые результаты.

8.15.1. Методы разделения

1. Описано разделение 24 аминокислот, в том числе лейцина и изолейцина, на пластинках 200×200 мм, покрытых слоем целлюлозы MN-300 (фирма Macherey Nagel and Co.) толщиной 100 мкм [190]. Общее время анализа 6 ч.

Растворитель для первого направления: пропан-2-ол-муравьиная кислота — вода (40 : 2 : 10); для второго направления; *трет*-бутанол — метиэтилкетон — 0,88 NH_3 — вода (50 : 30 : : 10 : 10).

2. Предложена улучшенная система растворителей, позволяющая разделить 40 аминокислот и родственных соединений на целлюлозных пластинках MN-300 без связующего агента [147]. Растворитель для первого направления: пропан-2-ол — 2-бутанон — 1 *М* HCl (60 : 15 : 25), для второго направления: 2-метилпропанол — 2-бутанон — пропанон — метанол — вода — 0,88 NH_3 (40 : 20 : 20 : 1 : 14 : 5). Пластинки перед употреблением промывают от загрязнений. Камера должна быть насыщена каждым из компонентов смеси растворителей. После прохождения в первом направлении высушивают пластинку 15 мин холодным воздухом, затем 15 мин при 60 °С для удаления следов HCl перед хроматографией во втором направлении. Время прохождения растворителей в каждом направлении 2,5 ч. На рис. 8.3 схематически показаны результаты разделения смеси 24 аминокислот.

Та же система растворителей была использована для разделения 76 N-содержащих метаболитов, найденных в биологических жидкостях; идентификация осуществлялась с помощью селективно окрашивающих реагентов [149] (разд. 8.14).

3. Тонкослойные пластинки Avicel (фирма Analtech) исследованы для одно- и двумерного разделения аминокислот в 6 системах растворителей. Приведены значения R_f для 35 аминокислот. В препаративных экспериментах использовалась нагрузка до 0,05 *М* вещества [87].

4. Разделение 19 аминокислот проведено на тонкослойных пластинках с обращенной фазой, в том числе с C_{18}, химически связанной с силикагелем [338].

5. Представляет интерес разделение 24 аминокислот на вольфрамате олова, однако этот метод не дает никаких преимуществ по сравнению с другими методами [272].

8.16. Колоночная хроматография аминокислот

8.16.1. Колонки и буферы

Сульфированный полистирол, сшитый с дивинилбензолом, впервые использован Муром и Стейном в ионообменной хроматографии аминокислот [263—267, 348] и до настоящего времени широко применяется в лабораторной практике [347].

Аминокислоты в катионной форме при низком pH связываются с отрицательно заряженными сульфогруппами носителя. С повышением pH элюирующего буфера (обычно цитрата натрия) уменьшаются положительные заряды аминокислот и тем

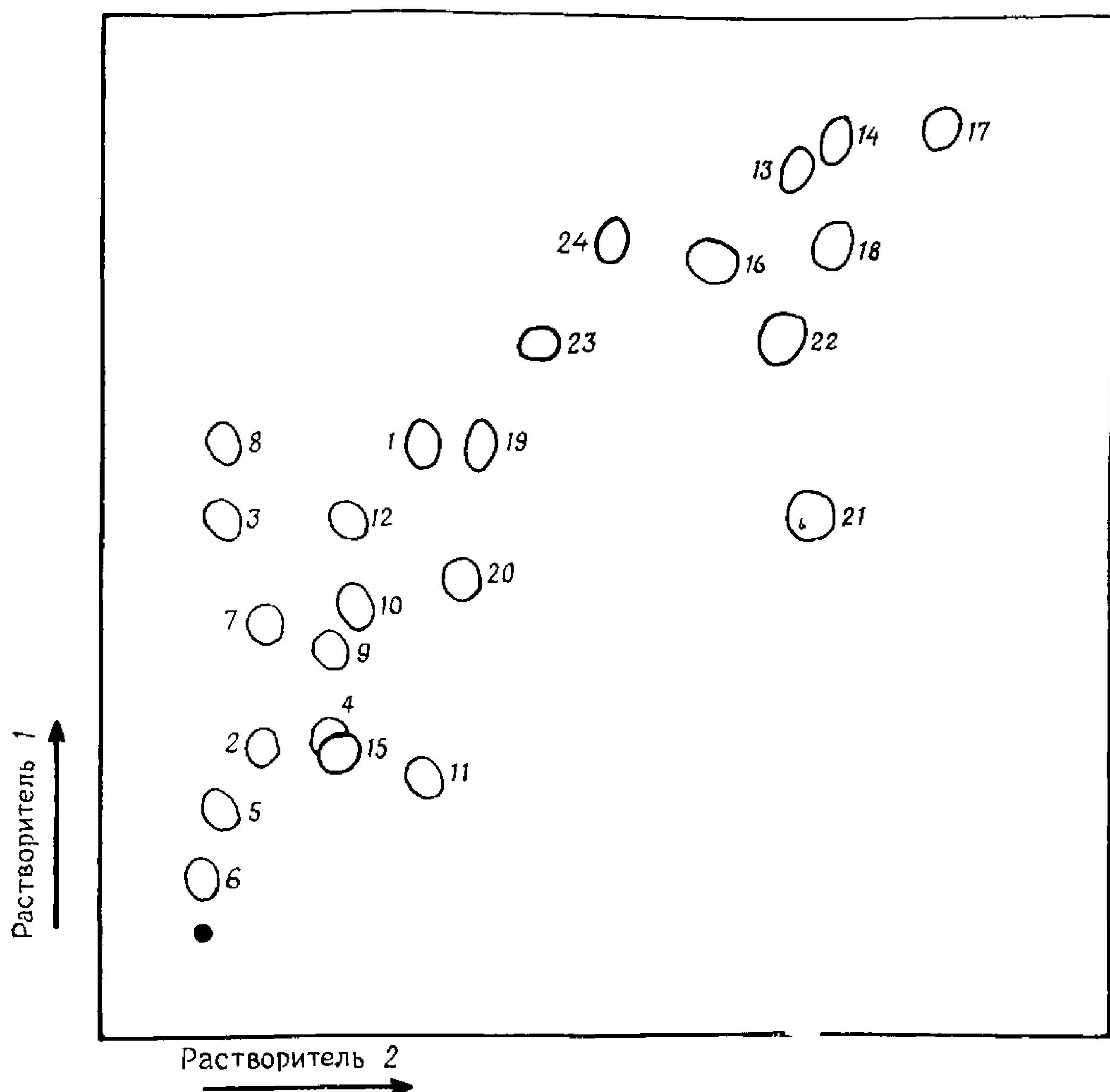


РИС. 8.3. Двумерная тонкослойная хроматография аминокислот на пластинках с целлюлозой. Состав растворителей указан в тексте.
1 — Ala, *2* — Arg, *3* — Asp, *4* — Asn, *5* — Cys, *6* — Cys-Cys, *7* — Cya, *8* — Glu, *9* — Gln, *10* — Gly, *11* — His, *12* — Hyp, *13* — Ile, *14* — Leu, *15* — Lys, *16* — Met, *17* — Nle, *18* — Phe, *19* — Pro, *20* — Ser, *21* — Thr, *22* — Trp, *23* — Tyr, *24* — Val [147] (с разрешения авторов).

самым силы взаимодействия со смолой, что приводит к их последовательному элюированию с колонки. Определяет очередность выхода аминокислот с колонки pH элюирующего буфера. Но катионы Na^+ в буфере конкурируют за центры связывания с сульфогруппами и, хотя аминокислоты имеют более сильное сродство к смоле, они постепенно замещаются ионами натрия вследствие более высокой концентрации последних в среде. Природа боковой цепи также влияет на порядок элюирования, например тирозин ($pK_a=9,1$), содержащий ароматический радикал, элюируется после лейцина ($pK_a=9,7$). В двухколоночном методе первая колонка (0,9×120 см) с амберлитом IR-120 служит для разделения кислых и нейтральных аминокислот с помощью двух элюентов: 1) 0,2 М Na^++0,1 М цитратный буфер

(pH 3,25); 2) 0,2 М Na^++0,1 М цитратный буфер (pH 2,25). Вторая колонка (0,9×15 см) используется для анализа основных аминокислот; состав элюента: 0,35 М Na^++0,12 М цитрат (pH 5,28). В работе [357] эти результаты критически обсуждаются.

Осуществить двухколоночную систему сложно чисто технически; кроме того, она не удовлетворяет и современным требованиям, поскольку в два раза увеличивается расход материала и соответственно возрастает вероятность ошибок.

Некоторые затруднения при количественной оценке результатов возникают при больших различиях в концентрациях компонентов смесей, когда часть пиков аминокислот находится в пределах шкалы измерений, а другая выходит за нее и не может быть корректно рассчитана. В таком случае повторяют анализ с меньшим количеством образца, а окончательные результаты выводятся из суммы двух определений. Проблему такого рода можно решить, записывая кривую элюирования одновременно при высокой и низкой чувствительности детектора или применяя линейно-логарифмическое преобразование электрического сигнала с выводом на диаграммную ленту самописца или интегратора, что позволяет определить площадь всех пиков.

Разработано много различных буферных смесей для разделения всех аминокислот в однократном процессе на одной колонке. В программы включались по три или даже четыре дискретных изменения буферных систем. Их не трудно установить и проконтролировать, но при смене буфера всегда наблюдается повышение базовой линии, вызванное хроматографическим смещением примесных пиков и небольшими изменениями коэффициентов преломления растворов [10].

Непрерывные буферные градиенты [297] менее популярны из-за трудности точного воспроизводства, однако с введением современной техники ВЭЖХ проблемы, связанные с созданием непрерывных буферных градиентов и точной подачей на колонку малых объемов растворов, в значительной степени преодолены. В 1972 г. описана система [18] с тремя буферными растворами, имеющими pH 3,25, 3,50 и 3,65 с повышающейся концентрацией ионов натрия (0,02, 0,70 и 1,60 моль/л). В этих условиях могут возникнуть осложнения только из-за расширения или сжатия упаковки колонки при изменении молярности элюента. Одновременно появилось сообщение [141] о системе из четырех буферов с постоянным содержанием Na^+ (0,20 моль/л) pH — 3,25, 4,15, 5,25 и 10.10.

Возможность работы на самой высокой из возможных чувствительности определяется необходимостью отсутствия «фоновых шумов» на ленте самописца благодаря применению растворителей и реагентов высокой степени чистоты (разд. 8.3).

Тест на чистоту буферов. Для приготовления натрийцитратного буфера растворяют 20 мг $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ в 1 мл воды (концентрация Na^+ ~0,2 М) и добавляют 40 мкл «чистой» 1 М HCl до pH 2,0. Вводят 100 мкл этого раствора в ионообменную колонку и сравнивают хроматограмму с полученными данными для воды и соляной кислоты [142].

Для нахождения оптимальных условий разделения можно менять pH, молярность, скорость потока буфера и температуру колонки. Буферы должны быть приготовлены на воде и из реагентов высокой степени чистоты. Значения pH устанавливают с точностью 0,001 ед. и растворы буферов хранят под азотом. Обычно вводят в первый буфер (pH 3,25) ~2% (по массе) изопропилового или этилового спирта для улучшения разделения Thr и Ser. Коммерческие приборы снабжены полной технической документацией для их эксплуатации, но каждый работающий оператор, конечно, должен сделать свою корректировку программы анализа методом проб и ошибок.

На рис. 8.4 и 8.5 приведены кривые элюирования аминокислот, полученные с помощью анализатора фирмы Beckman.

Замечание к рис. 8.4: повышение базовой линии происходит при введении нового буфера на колонку после 42 и 56 мин. На рис. 8.5 приведены результаты разделения (при высокой чувствительности) гидролизата гликопротеина, содержащего глюкозамин и галактозамин (указаны). С обзорами по аминокислотному анализу можно познакомиться в статьях [19, 20, 28, 138, 139, 142, 300].

Для лучшего разделения многокомпонентных смесей нингидринположительных соединений плазмы и других биологических жидкостей было предложено использовать при ионообменной хроматографии литийцитратные буферы [264]. Хроматография в одноколоночном варианте применена для разделения 65 соединений за 20 ч [296]. На двухколоночной системе удалось разделить 41 соединение за 7,5 ч [18] и 55 соединений за 9,5 ч [270].

8.16.2. Внутренние стандарты

К раствору белка до гидролиза добавляется точно известное количество аминокислоты — внутреннего стандарта, выход которого принимается за основу для расчета выходов аминокислот белка. При использовании двухколоночного метода требуются разные стандарты. Выбор стандартного соединения определяется индивидуальными особенностями каждой колонки и отчасти пристрастиями и привычками исследователя. В любом случае надо попытаться найти оптимальный вариант. Для длинной колонки можно попробовать норлейцин, норвалин или нитротирозин, для короткой колонки (для основных аминокислот) — диаминопимелиновую кислоту или гомоаргинин [314].

8.16.3. Определение аминокислот

8.16.3.1. Постколоночная модификация. До начала 70-х годов элюирующиеся с ионообменной колонки аминокислоты детектировались реакцией с нингидрином, смешивание с реагентом

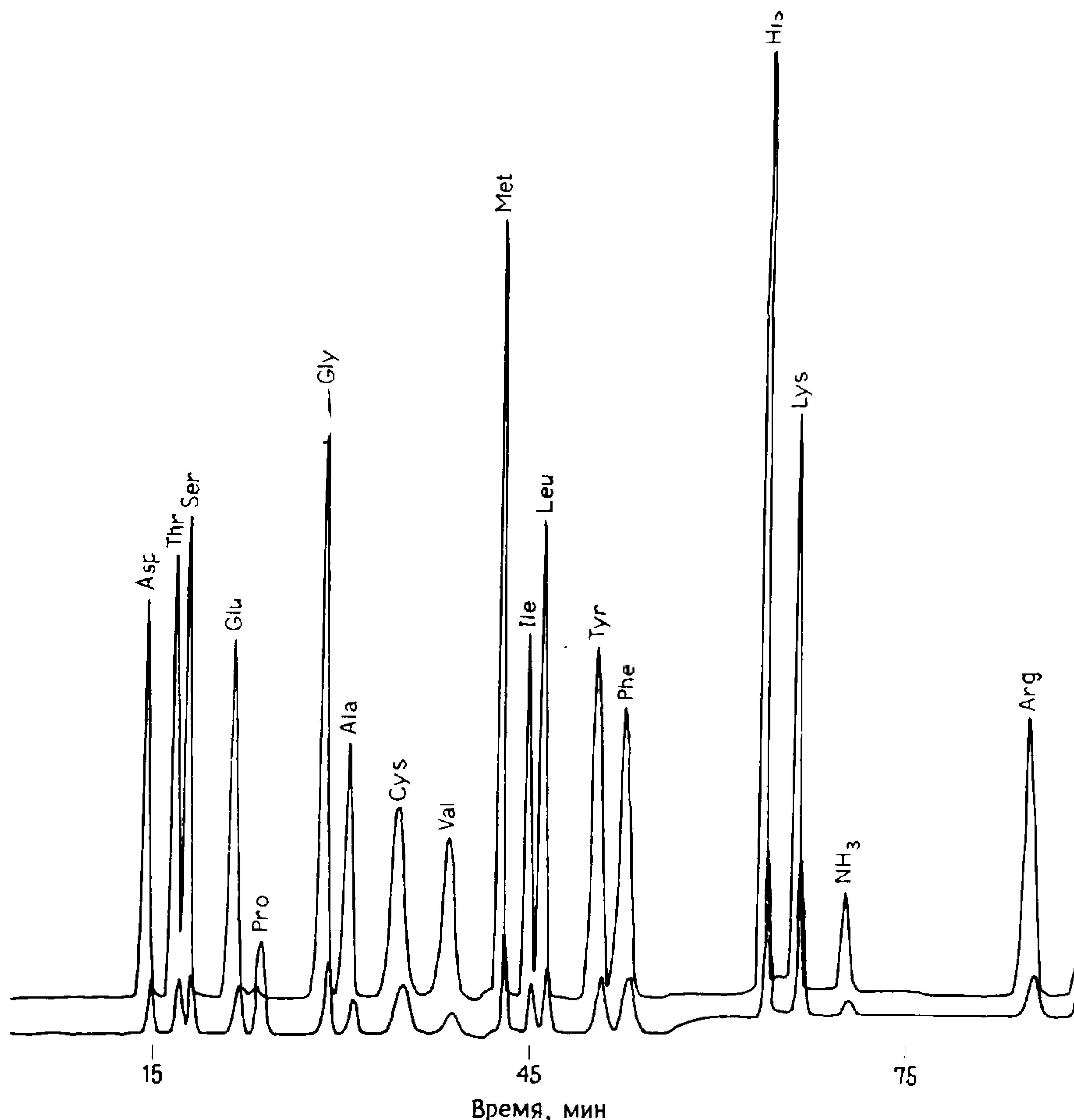


РИС. 8.4. Разделение аминокислот ионообменной хроматографией в одноколоночной системе. Колонка (6×460 мм), заполненная смолой типа W-3 до высоты 220 мм. Натрийцитратные буферы: pH 3,25 (0,2 M Na^+, с 1%-ным пропанолом-2; pH 3,95 (0,4 M Na^+); pH 6,4 (1,0 M Na^+). Температура 50—60 °C. Скорость потока 44 мл/ч (буфер), 22 мл/ч (нингидрин). Кювета 12 мм. Вся шкала 2,0 *A*. Смесь аминокислот для построения градуировочного графика (50 нмоль каждого компонента в 100 мкл). С разрешения фирмы Beckman.

проводилось в послеколоночном реакторе с последующим прохождением раствора через нагретую спираль. Интенсивность образующейся окраски измерялась сначала в одном колориметре при 570 нм, а затем в другом, где при 440 нм определялась концентрация пролина и гидроксипролина.

В 1972 г. в качестве селективного флуорогенного реагента на первичные амины был предложен флуорескамин [375], а не-

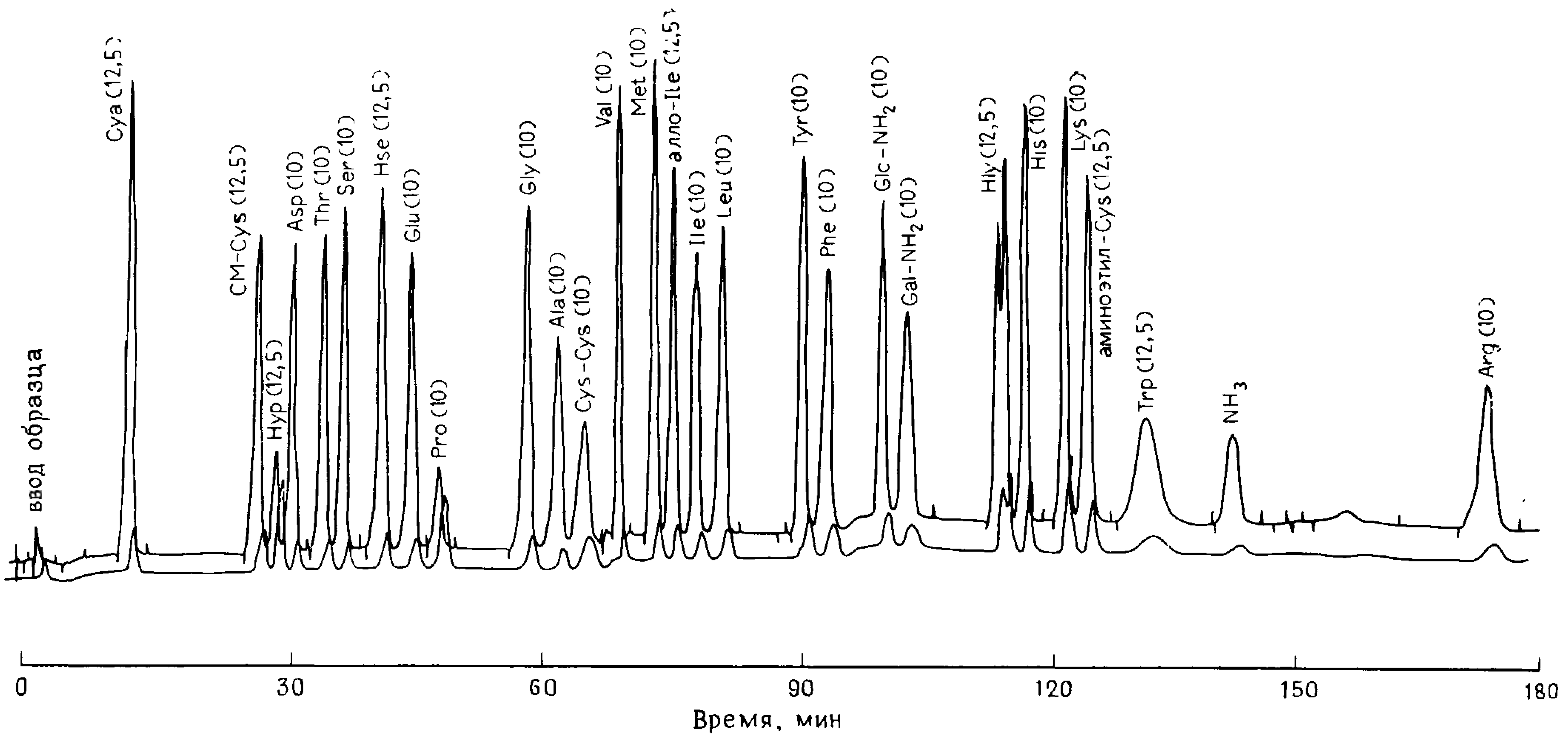


РИС. 8.5. Одноколоночное разделение аминокислот (гидролизат гликопротеина). Анализатор фирмы Beckman, модель 119CL. Колонка (6×460 мм), заполненная смолой типа W-3H до высоты 370 мм. Na-цитратные буферы фирмы Beckman: pH 3,33 (0,20 M Na^+); pH 4,25 (0,20 M Na^+); pH 6,04 (1,0 M Na^+). Температура 30 и 60 °C. Скорость потоков 30 мл/ч (буфер), 15 мл/ч (нингидрин). Кювета 12 мм. Вся шкала 0,5 *A*. Объем образца 100 мкл. Концентрация (нмоль) каждого компонента указана в скобках над пиком. С разрешения фирмы Beckman.

сколько позднее он стал использоваться для модификации аминокислот после их выхода с колонки аминокислотного анализатора. Получаемая при этом чувствительность определения в 10—100 раз превышала возможности нингидринового метода [21]. Для измерений применялся флуориметр с длиной волны возбуждения 340 нм и эмиссией при 450 нм. Широкому распространению флуорескамина помешали его нестабильность в водных средах и высокая стоимость. Этих недостатков лишен введенный в практику почти одновременно с флуорескамином [320] *о*-фталевый альдегид (ОФА), вытеснивший в значительной степени флуорескамин и применявшийся в аминокислотных анализаторах многими исследователями. Образование флуоресцирующего производного с ОФА с максимумом возбуждения при 360 нм и максимумом эмиссии при 455 нм происходит при pH 9—11. Лизин дает слабую флуоресценцию, усиливающуюся при добавлении реагента бриджа. Цистеин реагирует только в присутствии иодоуксусной кислоты [78], а цистин лучше определять в виде цистеиновой кислоты после окисления надмуравьиной кислотой. Пролин, гидроксипролин и вторичные амины вступают в реакцию только после окисления хлорамином-Т, N-сукцинимидом или гипохлоритом [33, 178, 321]. Если нет необходимости определять пролин и гидроксипролин, то безусловно выгодно использовать ОФА; чувствительность определения производных достигает 5 пмоль, для нингидрина она составляет 100 пмоль, как для первичных, так и для вторичных аминогрупп. Среднее относительное стандартное отклонение для аминокислот равно 6% (разброс 3—24%) [85].

Более поздние методы определения аминокислот с постколоночной модификацией основаны на использовании таких флуорогенов, как 7-хлоро-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол, позволяющий обнаружить все аминокислоты, включая пролин и гидроксипролин, на уровне 1 пмоль [415], и 4-фторо-7-нитробензо-2,1,3-оксадиазол [391] с пределом обнаружения 5 пмоль для пролина и 20 пмоль для других аминокислот.

8.16.3.2. Предколоночная модификация. Применение постколоночной модификации сопряжено с техническими трудностями осуществления смешивания каждой разделяемой аминокислоты в элюате с раствором реагента в соответствующих, оптимальных для реакции условиях. Провести предколоночную обработку аминокислот реагентами проще, а полученные соединения могут быть разделены с помощью ОФ-ВЭЖХ, но по имеющимся данным, воспроизводимость результатов уступает достигаемой в постколоночном методе. Наиболее изученные производные аминокислот — фенилтиогидантоины — продукты деградации пептидов по методу Эдмана (гл. 13) не использовались непосред-

ственно для анализа аминокислот, хотя детально разработаны несколько методов их идентификации, в том числе ВЭЖХ [186, 420]. Методом ВЭЖХ за 30 мин разделяются также окрашенные аналоги ФТГ — диметиламиноазобензолтиогидантоины [412] (см. гл. 14).

Обзор по предколоночной модификации аминокислот и пептидов с последующим разделением производных ВЭЖХ см. в работе [360].

Дансиламинокислоты. Для идентификации дансиламинокислот при определении аминокислотной последовательности белков широко используется метод тонкослойной хроматографии (гл. 10 и 11). Недавно дансильные производные были успешно разделены на колонках с обращенной фазой [15, 152, 167, 202, 330, 340, 363, 394, 403]. Чувствительность обнаружения составляет 100 пмоль при спектрофотометрическом и несколько фемтамолей при флуоресцентном [15, 202] или хемилюминесцентном определениях [166, 200].

Дансильные производные при анализе аминокислот не дают результатов, сравнимых с получаемыми при использовании ОФА. Один из недостатков дансилирования состоит в том, что для одной аминокислоты возникает несколько пиков, например пик O-дансилтирозина и O,N-дидансилтирозина наряду с пиком N-дансилтирозина. Преимущество же состоит в возможности одновременной с другими аминокислотами идентификации пролина и гидроксипролина. Было предложено применять [403] дансильные производные аминокислот для анализа состава пептидов с высокой степенью чувствительности и для количественного определения N- и C-концевых остатков, в частности C-концевых остатков амидов аминокислот, отщепленных ферментативными методами от амидированных пептидов на уровне 50 пмоль с УФ-детекцией [340]. D- и L-изомеры дансиламинокислот разделены методом ВЭЖХ [209, 208].

Производные с о-фталевым альдегидом. о-Фталевый альдегид реагирует с аминокислотами в присутствии β-меркаптоэтанола при 25 °C с образованием замещенного изоиндола [341]. Соединения, не содержащие α-водородного атома, дают флуоресцентный сигнал, составляющий по интенсивности <1% флуоресценции эквивалентного количества глицина [83], для цистина эта величина составляет 3%, даже если реакция проводится при 100 °C [84].

В присутствии меркаптоэтанола реакция ОФА с первичными аминогруппами завершается за 0,1—1,0 мин, но образующиеся производные глицина, лизина, гидроксилизина и фосфосерина имеют период полупревращения 1—4 мин [374]. Была изучена стабильность ОФА-2-меркаптоэтанолпроизводных аминокислот [80] и проведено их разделение методом ВЭЖХ за 22 мин [79];

показано, что разрушение продуктов может быть сведено к минимуму при быстром введении в колонку. Интенсивность флуоресценции для лизина и гидроксилизина повышается до 40—50% при добавлении к реакционному раствору реагента бридж-35. Цистин может быть определен количественно в виде цистеиновой кислоты и карбоксиметилцистеина.

Вторичные аминокислоты (пролин и гидроксипролин) не взаимодействуют с ОФА непосредственно, но при их окислении гипохлоритом образуются первичные аминогруппы, вступающие в реакцию. Эти аминокислоты могут быть определены также после модификации 4-хлоро-7-нитробензофураном (НБФ) [376]. Прекрасные результаты были получены при разделении ОФА производных аминокислот методом ВЭЖХ с флуорометрическим детектором [79, 160, 161, 163, 187—189, 210, 219, 376].

Новые возможности не только для повышения чувствительности определения, но и селективности обнаружения некоторых производных, например основных аминокислот [191], открывает применение электрохимических детекторов.

Автоматизация анализа флуорогенных соединений предъявляет повышенные требования к их устойчивости, которым не удовлетворяют аддукты ОФА-меркаптоэтаноламинокислоты. Более длинный период полупревращения имеют ОФА-этантиольные производные. Хотя падение интенсивности флуоресценции на 20—50% за 6—8 ч наблюдается и у этих соединений [342], процесс их синтеза и последующего разделения в автоматическом варианте был опробован при исследовании аминокислот плазмы [111].

В 1984 г. описан [74] автоматический рутинный метод анализа ОФА-производных аминокислот на колонке Altex Ultrasphere ODS (250×4,6 мм) с размером частиц 5 мкм с предколонкой Brownlee, заполненной сорбентом C_{18} (5 мкм). В этой системе без смены носителя удалось проанализировать более 2000 образцов.

ОФА был введен в программу автоматического анализа аминокислотной последовательности на секвенаторе для блокирования α-аминогрупп «остаточных» пептидов, когда пролин становится N-концевым в определяемой последовательности [41].

Реагенты для модификации с помощью ОФА.

ОФА-реагент [*214*]. Растворяют 62 г борной кислоты и 25 г КОН в 900 мл воды. Подщелачивают до pH 10,4 45%-ным КОН и доводят до объема 1 л. Фильтруют через мембрану Millipore 0,22 и добавляют 2 мл меркаптоэтанола, 6 мл 30%-ного (масс./об.) бридж-35 и 1,2 г ОФА, растворенного в 15 мл метанола. Выдерживают в течение ночи в темноте под азотом при комнатной температуре. Реагент стабилен в течение 1 мес под азотом при 4 °С. ОФА использовался для определения аминокислот на уровне 10 пмоль [214] и фосфоаминокислот (разд. 8.11.2.3).

Реагент ОФА — этантиол [206]. Растворяют 100 мг ОФА в 5 мл метанола. Добавляют 50 мкл этантиола (ЭТ) и 10 мл 0,15 М натрийборатного бу-

фера (pH 10,5), содержащего 0,2% реагента бридж-35. Смесь продувают азотом и оставляют стоять в темноте по крайней мере на 16 ч. Для сохранения стабильности каждые 4 дня к реагенту добавляют 10 мкл ЭТ (разд. 8.12.2.3).

Предколоночная дериватизация ОФА [187, 188].

Реагенты. Растворяют 50 мг *о*-фталевого альдегида в 1,25 мл метанола и добавляют 50 мкл 2-меркаптоэтанола и 11,2 мл 0,4 *М* боратного буфера подщелаченного до pH 9,5 с помощью 4 *М* NaOH. Реагент стабилен в течение 1—2 недель. Можно использовать раствор реагента фирмы Pierce. Он содержит ОФА в боратном буфере с добавкой реагента бридж-35 и 2-меркаптоэтанола. Реагент стабилен 6 мес при 4 °С.

Модификация. Белок гидролизуют в 6 *М* HCl, лиофилизуют и остаток растворяют в воде. Если для гидролиза использовалась метансульфокислота, гидролизат нейтрализуют 4 *М* NaOH. Разбавляют, если необходимо, 0,4 *М* боратным буфером (pH 9,5) до получения конечной концентрации по каждой аминокислоте $\leqslant$25 нмоль/мл. Перед гидролизом белок может быть окислен или карбоксиметилирован.

Аликвоту раствора образца 5—10 мкл смешивают с 5 мкл раствора реагента. Через одну минуту добавляют 20—100 мкл ацетата натрия (pH 7,0) и немедленно 20 мкл наносят на колонку. Внутренним стандартом служит 2-аминоэтанол.

Анализ сыворотки мочи или спинномозговой жидкости. Смешивают 25 мкл образца при энергичном размешивании с 75 мкл ацетонитрила. Центрифугируют при 1000 *g* 2 мин. Берут 10 мкл аликвоты для обработки ОФА.

ВЭЖХ. Используют колонки с носителем Ultrasphere ODS (45÷240)×4,6 мм с размером частиц 5 или 3 мкм и Microsorb C_{18} (100×4,6 мм). Необходима предохранительная колонка (CO : PELL сорбент ODS, 40 мкм), особенно для колонок с носителем C_{18} и размером частиц 3 мкм. Длина колонки практически не влияет на эффективность разделения аминокислот, поэтому предпочитают укороченные колонки (45—100 мм) для сокращения времени анализа. Иногда проблему составляет достижение четкого разделения глицина и треонина. Дело в том, что колонки даже одной фирмы значительно различаются между собой. В некоторых случаях глицин и треонин разрешаются полностью, на других колонках не удается достичь полного разделения даже варьированием состава элюирующей системы.

Измерения проводят на флуориметре с кюветой 9 мкл и фильтрами для возбуждения при 305—395 нм и эмиссии при 420—650 нм.

Для градиентного элюирования смешивают два предварительно дегазированных раствора:

Раствор *А*. 0,1 *М* ацетат натрия, pH 7,2 (для гидролизатов белков) или pH 6,4 (для физиологических жидкостей).

Раствор *Б*. Абсолютный метанол.

Линейная зависимость площади пика от количества нанесенного образца сохраняется в диапазоне 500 фмоль — несколько сотен пикомолей вещества; при содержании <5 пмоль наблюдаются значительные отклонения от линейности для таких аминокислот, как серин, глицин, аланин, из-за наложения фоновых примесей. В этих случаях необходимо проводить коррекцию результатов путем вычитания данных «глухого» опыта. Для большинства аминокислот чувствительность 25—50 фмоль, рабочий интервал 50 фмоль — 1 нмоль. На рис. 8.6 приведены результаты разделения аминокислот на колонке со смолой Ultraspere ODS (3 мкм) за 13,5 мин. Кривые элюирования гидролизатов вазопрессина и соматостатина в аналогичных условиях представлены на рис. 8.7.

Замечание. Смесь, содержащая более 60 аминокислот и аминов, была разделена с использованием предколоночной модификации с ОФА. Недавно на колонке Perkin Elmer C_{18} (4,6×32 мм), размер частиц 3 мкм (*Jones*, частное сообщение), проведен анализ менее чем за 7 мин. Цистеин определялся в виде карбоксиметильного производного, а метионин — в виде метионин-S-

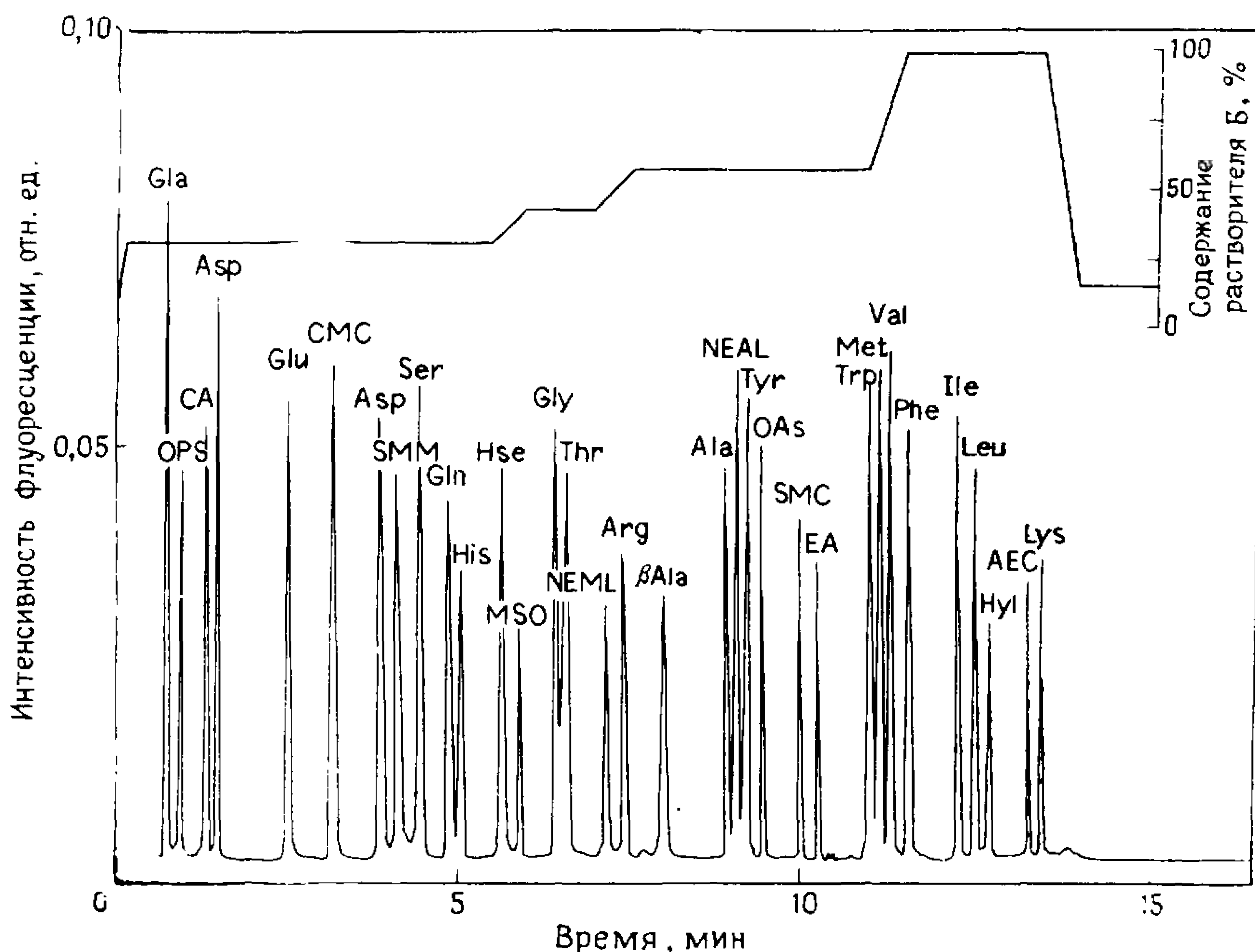


РИС. 8.6. Профиль элюирования смеси аминокислот, модифицированных ОФА. В каждом пике 40 пмоль вещества. Система ВЭЖХ включает два насоса (фирма Beckman, модель 100А), микропроцессор для создания режима градиентного элюирования (фирма Beckman, модель 421) и флуориметр (фирма Gilson, модель 121), снабженный 9-мкл кюветой и фильтрами с полосой пропускания 305—395 нм (для возбуждающего света) и 420—650 нм (для эмиссионного излучения). Эмиссионный фильтр снабжен диафрагмой с отверстием диаметром 2 мм. Диапазон шкалы флуориметра 0,1 отн. ед., временная константа 0,5 с. Образцы вводились в колонку с помощью инжекционного клапана (фирма Beckman, модель 210), снабженного петлей объемом 20 мкл. Хроматографические пики записывались и обрабатывались с помощью интегратора системы C-RIA. Колонка с обращенной фазой Ultrasphere ODS (75×4,6 мм, частицы 3 мкм) соединена с предколонкой (30×2,1 мм), наполненной сорбентом CO: PELL ODS (частицы 40 мкм). Скорость потока 1,5 мл/мин, исходное давление на колонке 3100 psi. Любезно предоставлено д-ром *B. N. Jones*.
Седьмой пик слева направо Asn.

оксида; пролин и гидроксипролин — по методу, описанному в работе [376].

Предколоночная дериватизация с 4-хлоро-7-нитробензофураном (НБФ) [376] используется для модификации пролина и гидроксипролина. Аликвоту нейтрализованного образца разбавляют, если нужно, до конечной концентрации пролина ~20 нмоль/мл. Смешивают равные объемы 0,4 М боратного буфера (pH 9,5) и метанольного раствора НБФ (2 мг/мл). Нагревают при 60 °С 5 мин в закрытом сосуде. Реакцию останавливают охлаждением до 0 °С. Аликвоту раствора наносят на колонку.

ВЭЖХ. Используется колонка Ultrasphere (250×4,6 мм) с частицами 5 мкм.

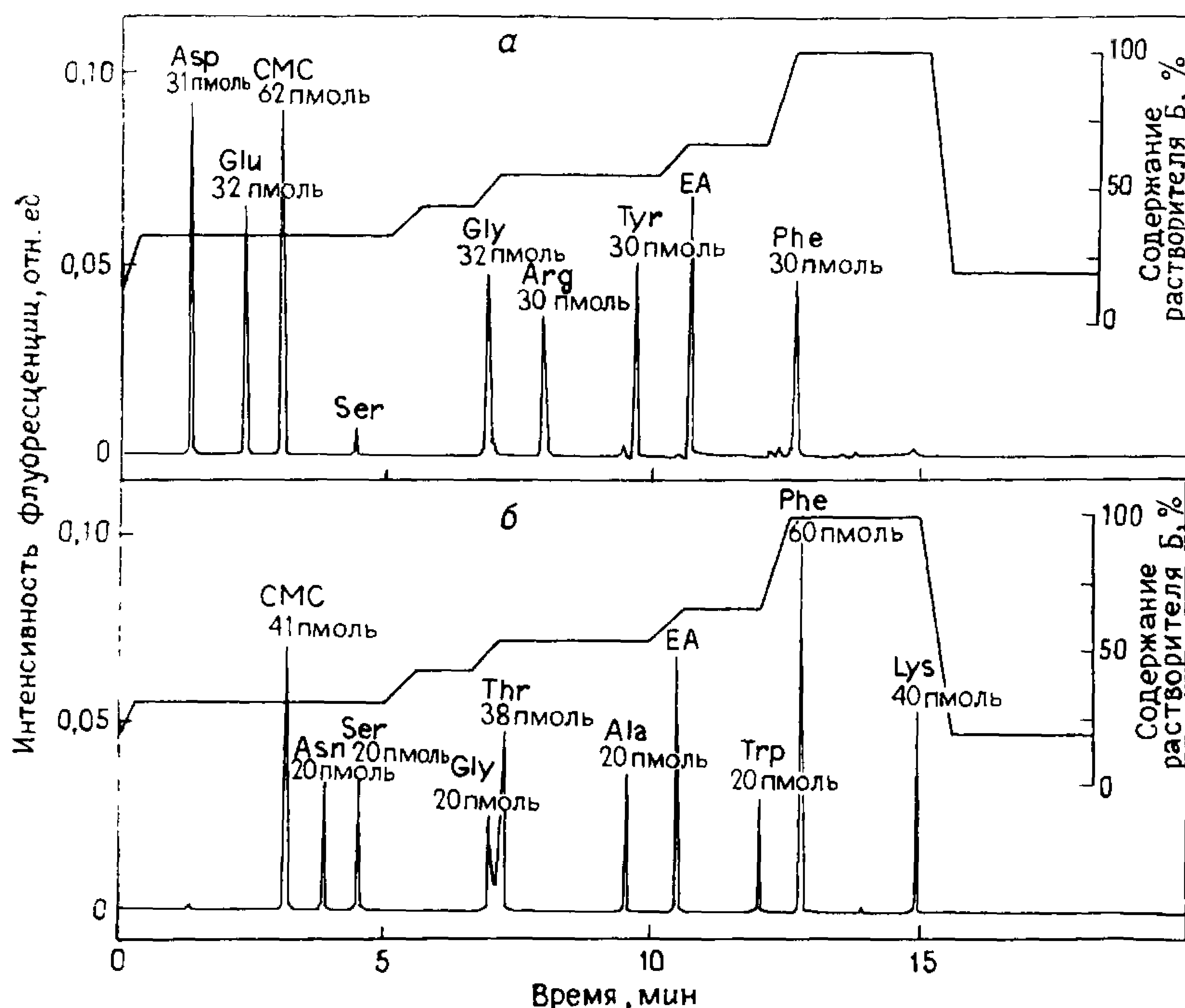


РИС. 8.7. Профили элюирования гидролизатов двух карбоксиметилированных полипептидов. Количество вещества в каждом пике выражено в пикомолях. *а* — кислотный гидролизат вазопрессина; найденные количества аминокислот находятся в хорошем соответствии с известным составом полипептида: Asp, Glu, CMC_2, Gly, Arg, Tyr, Phe; *б* — ферментативный гидролизат соматостатина; ожидаемый состав соматостатина из данных аминокислотной последовательности: CMC_2, Asn, Ser, Gly, Thr_2, Ala, Trp, Phe_3, Lys_2.

Растворитель *А*. Тетрагидрофуран — 0,05 *М* ацетат натрия (рН 6,6) (1 : 99).

Растворитель *Б*. Метанол.

Линейный градиент от 30% до 45% Б при скорости 1,5% Б в минуту. Скорость потока 1,0 мл/мин.

Обнаружение при длине волны возбуждения света 220 нм, эмиссии до 370 нм и шкалой чувствительности 0,1 мкА. НБФ-аддукты пролина и гидроксипролина элюируются в этих условиях за 6 мин.

Фенилтиокарбамильные производные. Реакция фенилизотиоцианата (ФИТЦ) с аминокислотами изучена детально, поскольку она лежит в основе методики деградации пептидов по Эдману, конечными продуктами которой являются фенилтиогидантоины [104]. Первая стадия этой реакции — образование фенилтиокарбамильных (ФТК) производных — используется для количественного определения аминокислот в так называемом PICO-TAG™-анализе, разработанном и внедренном фирмой Waters. ФТК-аминокислоты стабильны, легко синтезируются и успешно идентифицируются после разделения методом БЭЖХ на обращенной фазе. В реакцию вступают как первичные, так и вторичные аминогруппы аминокислот и разделяются все производные одновременно. Обнаружение с УФ-детектором при 254 нм; это дешевле и

проще, чем применение флуориметра для ОФА-производных. Для анализа был использован S^{35}, меченный ФИТЦ [76, 151, 199].

Предколоночная модификация фенилизотиоцианатом [151].

Реагенты. ФИТЦ (в 1-миллиметровых ампулах, запаянных в вакууме), триэтиламин («для секвенирования»), аминокислоты (фирма Pierce). Пиридин и триэтиламин перегнаны над нингидрином и гидридом кальция. Ацетонитрил и метанол для ВЭЖХ (фирма Burdik and Jackon). Буфер для конденсации: ацетонитрил — пиридин — триэтиламин — вода (10 : 5 : 2 : 3). Стабилен в течение месяца при —5 °С. ФТК-аминокислоты устойчивы, если хранятся замороженными при pH 6,8.

Модификация. В небольшой пробирке высушивают досуха гидролизат белка или раствор аминокислот. Растворяют остаток в 100 мкл буфера для конденсации и высушивают досуха на роторном испарителе или высокоскоростном концентраторе (Speed-Vac Concentrator). Эта предварительная обработка необходима для удаления следов HCl и дает возможность избежать появления постороннего пика на хроматограмме вблизи гистидина.

Добавляют 100 мкл буфера для конденсации и 5 мкл ФИТЦ. Оставляют на 5 мин при комнатной температуре. Упаривают и затем сушат в глубоком вакууме (0,5—10^{-2} мм рт. ст.). Вновь растворяют образующиеся ФТК-аминокислоты в 250 мкл 0,05 *М* аммонийацетатного буфера или смеси вода — ацетонитрил (7 : 2). Вводят с помощью инжектора 1—10 мкл (100—1000 пмоль каждой аминокислоты) на колонку с обращенной фазой. Аликвота может быть одновременно исследована на обычном анализаторе для контроля полноты превращения аминокислот в ФТК-производные.

ВЭЖХ. Используют обычно колонки (250×4,6 мм) с носителем C_8 и C_{18} и частицами 5 мкм (Altex, Dupont и IBM).

Системы растворителей:

А. 0,05 ацетат аммония (pH 6,8), подкисленный фосфорной кислотой.

Б. 0,1 *М* ацетат аммония (pH 6,8) в различных растворителях:

1) ацетонитрил — вода (50 : 50);

2) метанол — вода (80 : 20);

3) ацетонитрил — метанол — вода (44 : 10 : 46).

В. Ацетонитрил — вода (70 : 30).

Прекрасное разделение ФТК-аминокислот было получено с использованием градиента растворителей (см. ниже) при температуре колонки 52 °С и общем времени анализа 30—40 мин. Поглощение измерялось в УФ-свете при 254 нм:

Время, мин	Содержание растворителя, %		
	А	*Б*	*В*
0	100	0	0
15	85	15	0
30	50	50	0
30,1	0	0	100
40	100	0	0

Приведенная методика описана в работе [76]. В табл. 8.1 приведены коэффициенты молярного поглощения ФТК-аминокислот (последние указаны в порядке их элюирования с колонки).

Процедура определения аминокислотного состава, называемая PICO·TAG™-анализом, заключается в обработке избытком ФИТЦ нескольких (до 12 одновременно) образцов и удалении летучих компонентов в вакууме в специально сконструированном приборе. В диапазоне 5—1000 пмоль зависимость величины сигнала от количества вещества линейна. Возможна автоматизация процесса. Все белковые аминокислоты включая аспарагин, глутамин, цистеиновую кислоту, карбоксиметилцистеин, гомосерин, метионинсульфоксид и метионинсульфон, гидроксипролин и гидроксилизин могут быть проанализиро-

Таблица 8.1. Коэффициенты молярного поглощения ФТК-аминокислот в системах растворителей *А*, *Б* (1) и *В* (см. текст) [151]

Аминокислота	Молярное поглощение при 254 нм (1 моль/см)	Аминокислота	Молярное поглощение при 254 нм (1 моль/см)
Ala	15772	Arg	13874
Glu	14465	Pro	15235
КМ-Cys	15500	Tyr	16524
Hyp	15420	Val	16295
Ser	14824	Met	16716
Gly	15326	Ile	21375
His	12645	Leu	17069
Thr	15152	Phe	16293
Ala	16316	Lys	30224

ваны на специальной колонке PICO·TAG™. Результаты разделения стандартной смеси аминокислот (фирма Pierce H) в количестве 250 пмоль и 1 пмоль (за 12 мин) приведены на рис. 8.8 и 8.9.

8.17. Газожидкостная хроматография аминокислот

Аминокислоты могут быть превращены в летучие производные и затем проанализированы с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Существует единственный метод одностадийной модификации — триметилсилилирование, разработанный для качественного и количественного анализа всех белковых аминокислот [119, 121]. Серьезный недостаток метода заключается в том, что некоторые аминокислоты образуют мультиплетные пики; однако этим методом удается определить Asp и Glu в присутствии Asn и Gln.

Наиболее удачные варианты метода включают две стадии: 1) этерификацию карбоксильных групп и 2) ацилирование других реакционноспособных групп (амино-, гидрокси-, сульфгидрильных, гуанидино-). В табл. 8.2 приведены производные аминокислот, которые, как было показано, дают наилучшие результаты при разделении ГЖХ.

Подробному рассмотрению анализа аминокислот методом ГЖХ посвящены ряд отличных обзоров [28, 30, 170, 229, 395] и специальная монография [422].

При освоении этого метода нетрудно получить удовлетворительные качественные результаты, но достижение корректной количественной их оценки требует большей настойчивости. Ряд осложнений может возникнуть, в частности, с определением гистидина, аргинина, цистина, которые разрушаются на некоторых стационарных фазах [90, 123]. Наиболее интенсивно количественные исследования проводились Герке и его группой с *н*-бутиловыми эфирами трифтороацетиламинокислот и Маккензи и

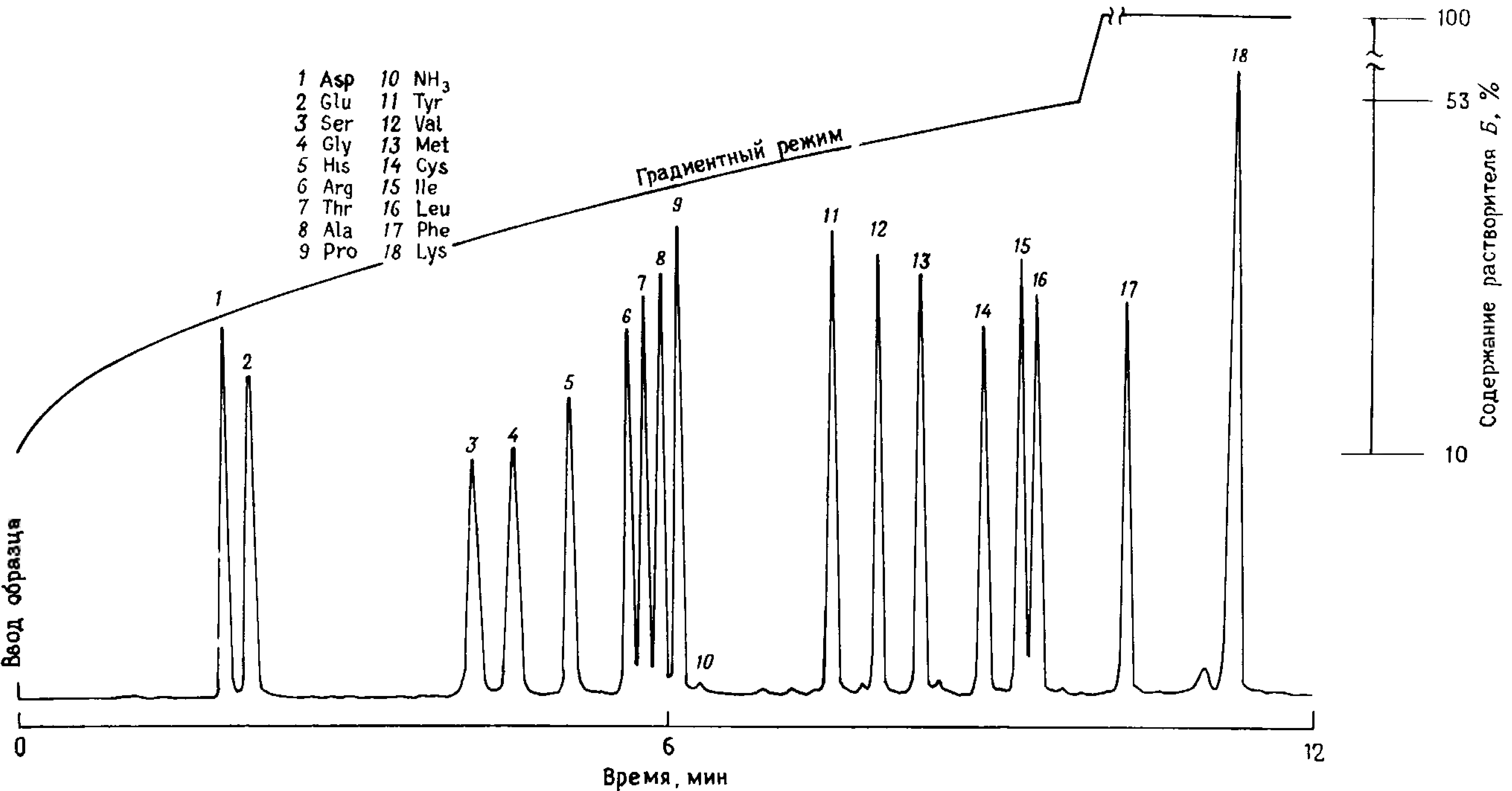


РИС. 8.8. Анализ методом Pico-Tag™ смеси аминокислот (250 пмоль, Pierce). Условия: Pico-Tag™-колонка (фирма Waters), 38 °C, детекция при 254 нм, шкала 0,1 отн. ед. Растворитель *А*: 6% ацетонитрила+94% 0,14 М ацетата натрия+3,6 мМ триэтиламина (pH 6,4). Растворитель *Б*: 60%-ный ацетонитрил в воде. Скорость потока 1 мл/мин. Градиент: 0—46% *Б*, 10 мин, промывка — 100% *Б*. (С разрешения Waters Associates.)

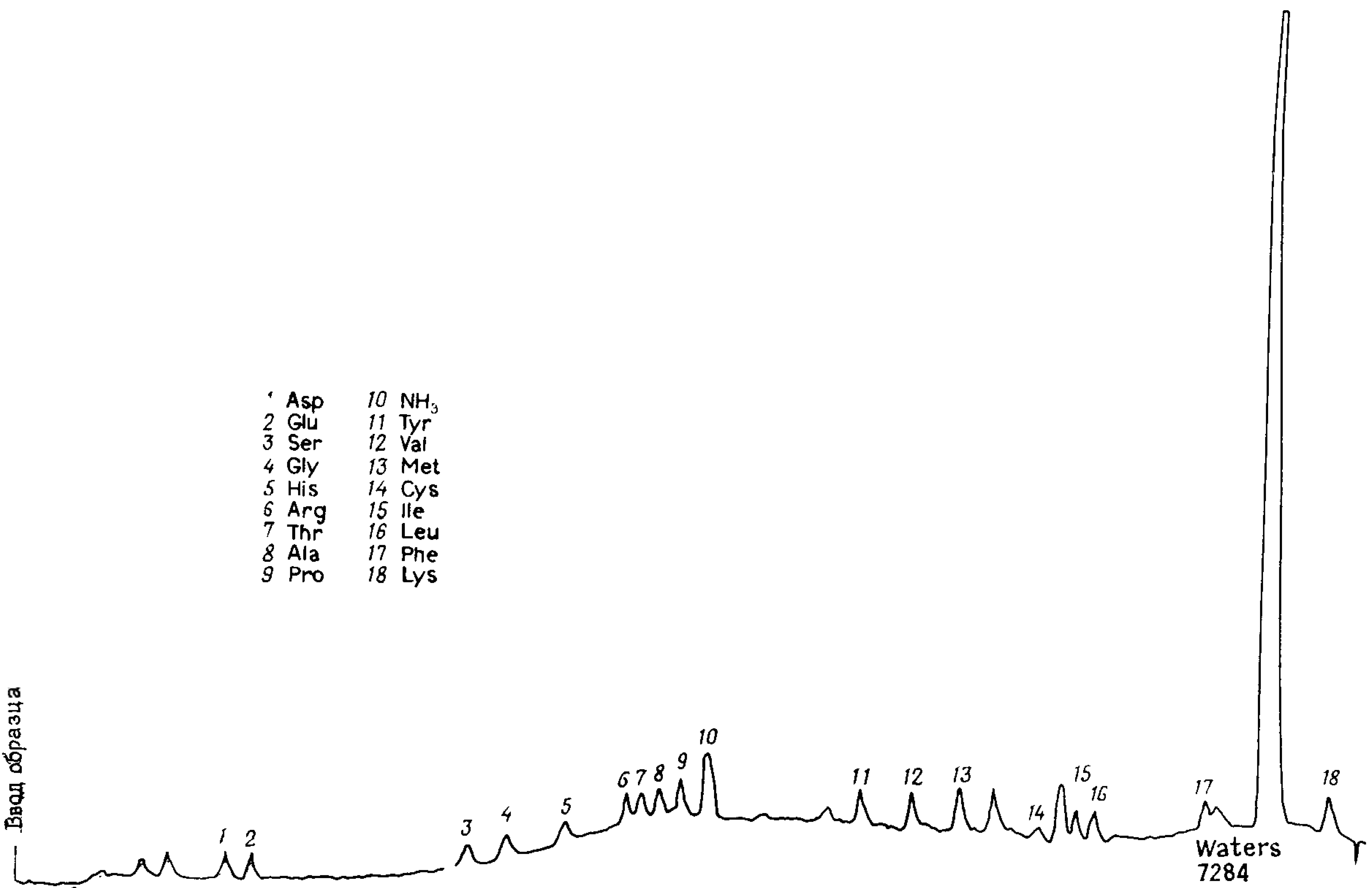


РИС. 8.9. Анализ методом Pico-Tag™ 1 пмоль аминокислот (фирма Pierce H). Шкала на 0,005 отн. ед., остальные условия, как на рис. 8.8. (С разрешения Waters Associates.)

Таблица 8.2. Некоторые производные аминокислот для газожидкостной хроматографии

Эфир	Ацильная группа	Литература
Метиловый	Трифтороацетильная	91, 73
н-Пропиловый	»	117, 118
	Гептафторобутирильная	198, 239
н-Бутиловый	Трифтороацетильная	315, 122, 422
Изобутиловый	Гептафторобутирильная	231,232, 233, 289,339, 96, 260, 57, 58, 261
Изоамиловый	»	418, 109

Танашук, изучавшими изобутиловые эфиры гептафторобутириламинокислот. Методики синтеза последних соединений, с которыми приходилось работать автору, приведены ниже.

Большинство исследователей для этерификации карбоксильных групп использовали метод Фишера — обработку спиртами с различной концентрацией HCl. Было предложено несколько модификаций, направленных на увеличение выходов продуктов. Обычно используется прямая, одноступенчатая процедура этерификации, но были разработаны и методы переэтерификации [120, 352], в которых метиловые эфиры аминокислот превращались в *н*-бутиловые, что позволяло избежать осложнений с трудной растворимостью некоторых аминокислот в высших спиртах. Однако позднее исследователи вернулись к первоначальному одностадийному варианту [316].

8.17.1. Общая методика приготовления образцов

К гидролизату белка добавляют определенное количество внутреннего стандарта, обычно норлейцина, поскольку он хорошо разделяется со всеми другими аминокислотами, но применялись также пипеколиновая и транэксамовая кислоты и гомоаргинин. Некоторые биологические препараты требуют предварительной очистки.

Очистка биологических препаратов. Образцы плазмы (100—500 мкл) депротонизируют обработкой сульфосалициловой кислотой (50 мг/мл плазмы).

1) Пастеровскую пипетку (40×3 мм) заполняют на 10 мм смолой дауэкс-50W (8% поперечных сшивок, 200—400 меш, H^+-форма); сверху и снизу набивки помещают небольшие пробки из стеклянной ваты.

Добавляют к образцу известное количество внутреннего стандарта, подкисляют до pH 1 и наносят на колонку. Удаляют некатионные примеси промывкой 2 мл деионизованной воды. Аминокислоты элюируют 2 мл 4 М NH_4OH со скоростью ~1 капля за 5—10 с. Элюат высушивают досуха [96].

2) Аминокислоты вновь растворяют в 0,1 М HCl и наносят на колонку (150×15 мм) с 7 мл катионообменной смолы амберлит CG-120 (H^+-форма, 100—120 меш). Промывают дважды 10 мл деионизованной воды. Элюируют

аминокислоты 2×10 мл 7 *М* NH_4OH, затем 5 мл деионизованной воды. Собирают элюат и высушивают досуха в вакууме на роторном испарителе при 60 °С [193].

8.17.1.1. Изобутиловые эфиры гептафторобутириламинокислот [231—233]. В большинстве случаев чувствительность пламенно-ионизационного детектора бывает достаточной для обнаружения этих производных. Для специальных целей использовались детекторы электронного захвата и термоионный, а также метод масс-спектрометрии [96, 230].

До и после этерификации следовые количества воды из образца могут быть удалены ацеотропной сушкой путем добавления метиленхлорида и упаривания. Для эффективного смешивания компонентов в процессе этерификации и ацилирования используют обработку ультразвуком или вибромешалки.

Приготовление спиртовых растворов HCl для этерификации. Спирт следует высушить над гранулированным сульфатом кальция (~50 г/л) или кипячением 3—4 ч над магниевой стружкой (с добавлением кристаллика иода, чтобы катализировать реакцию); после декантации кипятят еще 3—4 ч над гидридом кальция и перегоняют.

Необходимую молярную концентрацию HCl получают пропусканием сухого газообразного HCl в спирт до насыщения или до соответствующей массы, а затем после титрования щелочью разбавляют раствор до необходимого объема. Хранят в небольших склянках на холоду.

Когда требуется небольшое количество реагента для единичного образца, готовят его добавлением соответствующего количества ацетилхлорида к спирту на холоду (операция требует осторожности, поскольку реакция эндотермична) и доводят до нужного объема.

Этерификация. Образец смеси аминокислот (10—100 нмоль каждой аминокислоты) высушивают при 50 °С в сосуде типа Reactivial (фирма Pierce) в потоке сухого азота. Добавляют раствор 3 *М* HCl в изобутаноле (50—100 мкл) и выдерживают при 120 °С 30 мин. Через 5 мин после начала нагревания реакционную смесь встряхивают 20—30 с на вибраторе и продолжают нагревание. Охлаждают до комнатной температуры. Упаривают избыток реагента в потоке азота, это делается быстро, если сосуд нагрет до 50 °С. Следы воды могут быть удалены азеатропной сушкой с метиленхлоридом. Аналогичным образом были получены *н*-пропиловые эфиры аминокислот [118].

Ацилирование. Добавляют ангидрид гептафторомасляной кислоты (50 мкл) и нагревают при 150 °С 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры образец высушивают досуха в потоке азота. Слишком длительное выдерживание в потоке азота может привести к потере некоторых летучих производных.

Растворяют остаток в сухом перегнанном ацетонитриле или этилацетате (50 или 100 мкл). Вводят 1—2 мкл на колонку ГЖХ. Если в смеси присутствует гистидин, образец растворяют в смеси этилацетата и уксусного ангидрида (1 : 1) и нагревают 3 мин при 150 °С; по охлаждении до комнатной температуры разбавляют этилацетатом. Реакцию лучше всего проводить в нагревательном блоке, лунки которого заполнены силиконовым маслом на высоту жидкости в реакционном сосуде, при этом его верхняя часть служит обратным холодильником.

Поскольку в реакционных сосудах возможны потери из-за негерметичности, предпочтительно использование трубок (50×3 мм) из стекла пирекс, их запаивают и вскрывают на каждой стадии процесса.

Рекомендуется проводить анализ на колонке как можно быстрее после окончания реакции ацилирования (не позднее чем через 2—3 ч), что особенно важно для сохранения производных цистеина, цистина, метионина, аргинина, гистидина.

Колонки. Хорошее разделение и количественное определение изобутиловых эфиров гептафторобутириламинокислот достигнуто несколькими группа-

ми исследователей. При этом были использованы различные типы колонок (описаны ниже), но порядок элюирования был одинаковым во всех случаях. Для улучшения разделения могут быть введены изменения в температурную программу. Скорость потока газа-носителя, температура узла ввода и детектора подбираются индивидуально для каждого прибора и исследуемой колонки.

1. Капиллярная стеклянная колонка (25 м×0,4 мм), покрытая смесью фаз 5% хромосорба +15% OV-101. Газ-носитель — водород (3 мл/мин); газ-ускоритель — азот (30 мл/мин), водород (27 мл/мин), воздух (350 мл/мин). Температура колонки 90 °С, повышение по программе (4 град/мин). Порядок элюирования в течение 35 мин: Ala, Gly, Val, Thr, Ser, Leu, Ile, Nle, Pro, Cys, пипеколиновая кислота, Hyp, Met, Asp, Phe, Glu, Lys, Tyr, Arg, KM-Cys, His, HomoArg, Trp, Cys-Cys [57, 58].

2. Капиллярная колонка (25 м×0,23 мм), покрытая стационарной фазой OV-101 (фирма LKB) [96].

3. Стеклянная капиллярная колонка SCOT (60 м×0,5 мм) со стационарной фазой SE-30 (фирма SGE) [289].

4. Стеклянная колонка (3,5 м×2,5 мм), упакованная смолой Gas-Chrom Q (100—120 меш) с 3% фазы SE-30 (по массе) (Applied Science Laboratories) [231].

5. Стеклянная колонка (3,1 м×2 мм), упакованная хромосорбом WHP (100—120 меш) с 3% фазы SE-30 [232, 233].

6. Стеклянная колонка (3,5 м×2 мм) с Gas-Chrom Q (80—100 меш) с 3% фазы SE-30 (фирма Supelko) [289].

7. Стеклянная колонка (6 м×2 мм), упакованная Gas-Chrom Q (80—100 меш) с 3% фазы OV-101 [339].

8.18. Количественное определение белка

8.18.1. Введение

Количественное определение белков может быть осуществлено разными методами, основные из них рассмотрены ниже. В качестве стандарта обычно используют бычий сывороточный альбумин (БСА), его следует высушить в вакууме при 60 °С над P_2O_5 до постоянной массы (удобно делать это в «пистолете» Фишера). 1%-ный раствор БСА при 280 нм в 1-сантиметровой кювете имеет $A=6{,}6$ [362]. На практике при незначительном количестве белка невозможно определить точную массу образца, так как в образце содержатся минеральные примеси и влага [162]. В настоящее время общепринятым методом количественного определения белка является аминокислотный анализ. В 1973 г. были изучены образцы 350 белков и сделано заключение, что анализ, основанный на определении азота в белке, дает в большинстве случаев согласующиеся результаты.

8.18.1.1. Гравиметрический анализ. Этот метод требует значительных количеств материала (порядка миллиграммов).

8.18.1.2. Определение азота. Этот метод также требует большого количества белка, значительных затрат времени и достаточно сложен в экспериментальном отношении. Методика Кьельдаля

основана на полном разрушении белка под действием серной кислоты в присутствии катализатора. Азот белка улавливается в форме сульфата аммония и определяется в виде аммиака после перегонки с паром гидролизата, подщелаченного добавлением концентрированной NaOH. Аммиак обычно анализируется обратным титрованием после поглощения в кислотных ловушках, хотя возможны и другие методы, такие, например, как колориметрия или применение электродов, чувствительных к аммиаку [72]. Разработана система, объединяющая прибор для определения аммиака по Кьельдалю с программируемым устройством для титрования (фирма Buchi Lab. Techniues Ltd.). Метод все еще широко используется в пищевой и пивоваренной промышленностях, но в белковых лабораториях он вытеснен аминокислотными анализаторами, обеспечивающими в 100 раз большую чувствительность определения не только аммиака, но и одновременно аминокислотного состава [9, 39].

8.18.1.3. Аминокислотный анализ. Образец белка подвергается исчерпывающему гидролизу, и путем исследования гидролизата определяется аминокислотный состав. Каждая аминокислота может быть легко идентифицирована, если ее количество составляет 5—10 нмоль, а во многих специализированных лабораториях проводится анализ на уровне 50—100 пмоль аминокислоты.

8.18.1.4. Колориметрические методы. Многие из этих методов достаточно просты, но не все могут быть применены к данному конкретному белку. Ошибки в результатах чаще всего обусловлены тем, что исследуемый белок резко отличается по своей природе от белка-стандарта (обычно в качестве белка-стандарта применяется БСА).

1. *Биуретовый метод* основан на специфической реакции пептидной связи с ионами меди в щелочной среде; методика проста в экспериментальном отношении. Метод ограничен низкой чувствительностью (предел обнаружения белка 300 мкг/мл). Предложено много вариантов реагента с целью увеличения интенсивности окраски, стабильности ее и исключения наложения фона, вносимого соединениями с сульфгидрильными группами (такими, как дитиотреит).

2. Наиболее широкое применение нашел *метод Лоури* [225]. Возникающая окраска в основном определяется реакцией фенольного реагента (Фолина — Чикольте) с остатками Tyr, но определенный вклад дают некоторые другие аминокислоты — Trp, His и Cys, а также пептидные связи. Зависимость интенсивности окраски от количества белка-стандарта не линейна. Определению мешают детергенты, используемые для солюбилизации белков. Предложено много различных модификаций метода.

3. Неспецифическое связывание красителя. Ряд красителей был использован для определения белка по окраске, возникающей в результате простой адсорбции. Некоторые из них дают воспроизводимые результаты (в данных условиях) и достаточно высокую чувствительность, но степень связывания красителя зависит от индивидуальных свойств белка. Кроме того, зависимость степени сорбции от концентрации белка не линейна и у разных белков угол наклона кривой сильно различается.

Несколько примеров. Белок из ткани листьев определен с помощью реактивов цианин G и нафталиновый темно-голубой [40]. Сульфобромофталеин был использован для реакции с белком в кислых условиях; образовавшийся осадок комплекса белок — краситель отделяли центрифугированием и затем вновь растворяли в щелочи и измеряли оптическую плотность при 580 нм [34, 248]. Специфический метод определения коллагена (10 мкг—100 мкг) основан на реакции с красителем Sirius Supra red F3BA [192]. Очень широкое применение нашел кумасси бриллиантовый голубой [38, 336, 350].

Сравнительное изучение содержания белка в образцах из культуры клеток и субклеточных фракций было проведено с использованием методов Лоури и Бредфорда [61]. Метод Лоури дал завышенные результаты, но соотношение величин, полученных двумя методами, было постоянным (среднее значение $1{,}58 \pm 0{,}09$). Рекомендован метод Бредфорда из-за его большей скорости.

Ни один из колориметрических методов не может гарантировать получение корректных результатов со всеми белками, сказывается индивидуальная природа каждого белка и в некоторых случаях наличие загрязнений — детергентов, липидов и т. д., внесенных в процессе его выделения. Так, было показано, что реакция белков с гомобифункциональными сшивающими агентами вызывает падение интенсивности окраски с кумасси или комплексом серебра [217].

Несколько методов, рассматриваемых ниже, наиболее удовлетворяют современным требованиям.

8.18.1.5. Спектрофотометрические методы. Спектрофотометрические методы определения белков имеют ряд преимуществ по сравнению с другими методами и могут быть рекомендованы во многих случаях. Они просты, быстры и не вызывают структурных разрушений в исследуемом материале. Один из наиболее ранних прочно утвердившийся метод Варбурга и Христиана [388] основан на определении соотношения величин поглощения при 280 и 260 нм и позволяет определять белок в присутствии нуклеиновых кислот. В нескольких методах, предложенных позднее, для измерений используются другие длины волн.

8.18.1.6. Флуорометрические методы. Очень перспективен как высокочувствительный метод анализа флуорометрический метод естественно при условии, что в белок или полипептид можно ввести флуорогенную метку. Этет метод на конкретных примерах обсуждался в разд. 8.16.3.

8.18.2. Определение белка с помощью реактива Фолина — Чикольте

8.18.2.1. Метод Лоури [225].

Реагенты.

А. 2%-ный (масс./об.) раствор Na_2CO_3 в 0,10 M NaOH.

Б. 0,5%-ный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1%-ном Na- или K-тартрате.

В. Щелочной раствор меди. Смешивают 50 мл реагента *А* и 1 мл реагента *Б* (пригоден в течение 2 сут).

Г. Смешивают 50 мл 2%-ного (масс./об.) раствора Na_2CO_3 с 1 мл реагента *Б* (годен в течение 1 сут).

Д. Реагент Фолина — Чикольте. После приготовления надо использовать в тот же день; в настоящее время доступен комерческий препарат с более длинным сроком использования (хранение при 0—4 °С). Титруют аликвоту реагента до pH 10,0 (по фенолфталеину) и на основании результатов титрования разбавляют реагент приблизительно в два раза до концентрации 1 моль/л.

Белок-стандарт. Готовят раствор БСА или другого очищенного белка с концентрацией 500 мкг/мл. В пробирки вносят с помощью пипетки порции раствора 10 мкл — 200 мкл (5 мкг — 100 мкг) и разбавляют водой до 200 мкл.

Методика. В 3—10-миллилитровую пробирку вносят пипеткой 0,2 мл раствора белка (5—100 мкг) и приливают 1 мл реагента *В*. Смешивают на вибраторе и оставляют стоять на 10 мин. Быстро добавляют 0,10 мл реагента *Д*, перемешивают (общий объем 1,3 мл). Выдерживают 30 мин или немного дольше и измеряют поглощение против пробы «холостого» опыта. Находят концентрацию по градуировочному графику. Могут быть использованы любые кратные количества указанных объемов.

Если белок находится в разбавленном растворе (~25 мкг/мл), то на анализ берут 0,5 мл раствора образца, добавляют 0,5 мл реагента *В*, имеющего концентрацию в 2 раза выше, и 0,1 мл реагента *Д*.

При плохой растворимости белка в 0,1 M щелочном растворе реагента *А* к пленке высушенного белка (5—100 мкг) добавляют 0,1 мл 0,1 M NaOH, при необходимости нагревают. Затем к раствору приливают 1 мл реагента *Г* и через 10 мин — 0,1 мл реагента *Д*.

Замечание. Интенсивность окраски определяется природой белка, и ее зависимость от концентрации лишь приблизительно линейна в диапазоне 15—40 мкг белка (30—80 мкг при увеличении вдвое объемов реагентов). Методика проста, дает воспроизводимые результаты и достаточно чувствительна (~0,2 мкг белка). С помощью несложных операций градуировочный график для концентрации белка вплоть до 1,0 мг можно преобразовать в линейный [75].

Разработано несколько модификаций методики, чтобы исключить возможность ошибок из-за наложения фона примесей небелкового характера. Во многих случаях ошибки удается уменьшить путем внесения соответствующего соединения как в раствор стандартного белка, так и в контрольный («холостой») опыт.

Присутствие ДСН не оказывает влияния на реакцию [216], а меркаптоэтанол должен быть удален полностью перед добавлением реагента (обычно это делается тщательной сушкой образца в вакууме) [238]. От таких соединений, как катехоламины, также дающие окрашивание, белок должен быть предварительно освобожден осаждением трихлороуксусной кислотой [165, 279, 421]. Описана модифицированная процедура с использованием хлорамина-Т для растворов белков, содержащих пурины и/или сульфгидрильные соединения [157—159].

Опубликован обширный обзор, где рассмотрено влияние на определение белка по методу Лоури примесей различных соединений: пуринов, глицина,

гидразина, сульфата аммония (при конечной концентрации >0,15%) и фенола [299].

8.18.2.2. Упрощенный метод Лоури. Модификация Петерсона [298].

Реагенты.

1) Тартрат-карбонат меди (ТКМ). Медленно при перемешивании добавляют 20%-ный раствор карбоната натрия к раствору сульфата-тартрата меди до получения конечного раствора следующего состава: 0,1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + +0,2% тартрата калия+10% карбоната натрия. Раствор стабилен в течение 2 мес при 20 °С.

2) 0,8 М NaOH.

3) 10%-ный раствор ДСН (фирмы Sigman и Pierce).

4) Реагент Фолина — Чикольте (2 моль/л).

Рабочие растворы.

1) 0,15%-ный дезоксихолат натрия (ДОХ).

2) 72%-ная ТХУ.

3) БСА, 0,5 мг/мл. Срок хранения 5 сут (в холодильнике).

4) Реагент *А*. Смешивают равные объемы исходных растворов ТКМ, NaOH, ДСН и воды (можно хранить 2 нед при 20 °С). Небольшой осадок не мешает определению, если перед употреблением хорошо встряхнуть раствор.

5) Реагент *Б*. Разбавляют водой реагент Фолина — Чикольте (1 : 5).

Методика. Белок (5—10 мкг) разбавляют водой до конечного объема 1,0 мл. Добавляют 0,1 мл 0,15%-ного ДОХ и оставляют стоять 10 мин при 20 °С. Добавляют 0,1 мл 72%-ной ТХУ. Перемешивают и центрифугируют при 3000 *g* 15 мин. Жидкость с осадка отделяют декантацией (процедура осаждения может быть опущена, если отсутствуют примеси или в процессе измерения их присутствие учитывается).

К осадку белка добавляют 1 мл воды и 1 мл реагента *А*. Перемешивают до растворения и оставляют стоять 10 мин при 30 °С. Добавляют 0,5 мл реагента *Б*, быстро перемешивают. Через 30 мин измеряют поглощение при 750 нм. Уменьшение интенсивности окраски во времени составляет 1—2% в час при 20 °С. Зависимость поглощения от концентрации белка в логарифмических координатах линейна. Метод осаждения белка ТХУ из раствора в дезоксихолате применим как к растворимым, так и к мембранным белкам.

Белок в количестве 1—10 мкг может быть определен по этой же методике с уменьшением объемов всех реагентов в 5 раз.

8.18.2.3. Другие модификации метода Лоури, приводящие к линейной зависимости.

Метод 1 [144].

Реагенты.

А. 2 г KNa-тартрата и 100 г Na_2CO_3 растворяют в 500 мл 1,0 М NaOH и разбавляют водой до 1 л.

Б. 2 г KNa-тартрата и 1 г $CuSO_4$ растворяют в 90 мл воды и добавляют 10 мл 1 М NaOH.

Реагенты *А* и *Б* пригодны к употреблению в течение 6 месяцев, если хранятся в полиэтиленовых емкостях.

В. Реагент Фолина — Чикольте разбавляют водой (1 : 15). При титровании 1 м NaOH до pH 10 (по фенолфталеину) раствор должен быть 0,15—0,18 М по $[H^+]$, готовится ежедневно.

Методика. Образцы исследуемого белка и белка-стандарта разбавляют водой до 10 мл в пробирке диаметром 13 мм. Добавляют 0,9 мл реагента *А*, перемешивают и помещают на 10 мин в водяную баню при 50 °С. Охлаждают до комнатной температуры и добавляют 0,1 мл реагента *Б*, оставляют на 10 мин, затем максимально быстро добавляют 3 мл реагента *В* и перемешивают в течение 1 с. Нагревают 10 мин при 50 °С. Охлаждают и измеряют поглощение при 650 нм (во избежание помутнения раствора кюветы по окончании работы промывают HCl).

Замечание. Поглощение при 650 нм на 30% ниже, чем при 750 нм, но интенсивность окраски выше, чем при использовании оригинального метода Лоури; кроме того, зависимость оптической плотности от количества белка линейна в диапазоне 15—110 мкг. Утверждается, что низкая растворимость некоторых белков не затрудняет анализ. Влияют сахароза и тритон X-100 (как и в исходной методике).

Метод 2 [156].

Реагенты.

А. Растворяют 0,2 г тартрата натрия и 10 г Na_2CO_3 в 55 мл 1 *М* NaOH. Разбавляют дистиллированной водой до 100 мл.

Б. Растворяют 2 г тартрата натрия и 1 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 90 мл воды. Добавляют 10 мл 1,0 *М* NaOH.

В. Разбавляют реагент Фолина — Чикольте дистиллированной водой (1 : 2). Раствор готовят ежедневно.

Методика. Белок растворяют в 150 мкл воды, приливают 100 мкл 2 *М* NaOH. Перемешивают на вибраторе и добавляют 180 мкл реагента *А.* Смешивают, оставляют стоять 30—45 мин при комнатной температуре. Добавляют 20 мкл реагента *Б.* Смешивают. Оставляют стоять 20 мин или несколько дольше. При интенсивном перемешивании добавляют двумя порциями по 300 мкл реагента *В.* Выдерживают при комнатной температуре 30—60 мин и измеряют поглощение при 650 или 750 нм. Строят градуировочный график в диапазоне 0—50 мкг белка.

Замечание. В общих случаях градуировочные графики линейны до величины поглощения 1,1 и несколько большей при измерении при 750 нм. Увеличение концентрации реагента *В* приводит к улучшению результатов. Присутствие ДНС не мешает определению.

8.18.2.4. Метод Лоури. Определение в присутствии детергентов.

Метод 1 [386]. Определение белка возможно в присутствии ДСН и тритона X-100.

Реагенты.

А. Щелочной раствор меди. 250 мг этилендиаминтетраацетата меди растворяют в 800 мл дистиллированной воды. Добавляют 100 мл 20%-ного Na_2CO_3 (масс./об.) и 10 мл 10,0 *М* NaOH. Перемешивают и разбавляют водой до 1 л.

Б. 10%-ный раствор ДСН.

В. Реагент Фолина — Чикольте (фирма Harleco) разбавляют водой (1 : 1).

Белок-стандарт. Растворяют 50 мг БСА в 50 мл 0,1%-ного тритона X-100. Аликвоты этого раствора разбавляют до концентрации по белку 40, 60, 80, 100 и 120 мкг/0,2 мл.

Методика. Помещают 0,2 мл раствора белка в пробирку и добавляют 1 мл реагента *А.* Смешивают на вибраторе и оставляют стоять при комнатной температуре 15 мин. Добавляют 1 мл реагента *Б.* Смешивают, добавляют 0,1 мл реагента *В*, выдерживают 30 мин, после чего измеряют поглощение при 500 нм.

Замечание. Добавление 10%-ного ДСН обязательно, поскольку ДСН предотвращает образование осадка при приливании реагента Фолина к образцам, содержащим тритон X-100. В диапазоне 40—120 мкг зависимость поглощения от количества белка линейна. Допустимое содержание тритона X-100 в образце составляет $<1\%$, при большей концентрации детергента необходимо добавить соответствующее количество белка-стандарта, чтобы компенсировать образование окраски. Предложено перед определением по методу Лоури удалять тритон X-100 путем однократной экстракции изоамиловым спиртом [245].

Метод 2 [50].

Методика. Используют те же реагенты, что и в методе 1. Белок разбавляют до объема 0,7 мл. Добавляют 1 мл реагента *А.* Смешивают и оставля-

ют стоять при комнатной температуре 15 мин. Добавляют 0,5 мл реагента *Б*, затем 0,1 мл реагента *В* и быстро перемешивают. Оставляют стоять 30 мин при комнатной температуре, после чего измеряют поглощение при 500 нм. В качестве белка-стандарта используют БСА (0—60 мкг). Как стандарт, так и образец должны содержать одинаковое количество детергента.

Замечание. В присутствии ДСН (до концентрации 4,35%) допустимо наличие других детергентов до 1% (катскам, ионидет-Р40, твин-20) и 0,75% цетилтриметиламмонийбромида.

8.18.3. Определение белка с помощью биуретовой реакции

8.18.3.1. Микрометод [180].

Реагенты.

А. 0,21%-ный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 30%-ном NaOH. Чтобы предупредить выпадение осадка гидроксида меди этот раствор готовят следующим образом: 21 мл 1%-ного (масс./об.) водного раствора $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ добавляют к 75 мл 40%-ного NaOH, а затем уже разбавляют водой до 100 мл.

Б. 30%-ный NaOH.

Оба реагента могут храниться в склянках из пирекса в течение 6 мес.

Методика. К 2 мл раствора белка (0,02—0,53 мг/мл) добавляют 1 мл реагента *А*. Тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре 5 мин, после чего измеряют поглощение при 310 нм против «холостого» опыта. Готовят следующие смеси:

X_1 — 2 мл раствора белка+1 мл реагента *А*;
X_2 — 2 мл дистиллированной воды+1 мл реагента *А*;
Y_1 — 2 мл раствора белка+1 мл реагента Б;
Y_2 — 2 мл дистиллированной воды+1 мл реагента *Б*.

Поглощение белка равно $(X_1—X_2)—(Y_1—Y_2)$; используют градуировочный график.

Замечание. Этот метод — модификация предложенного ранее [417]; методика может быть использована в присутствии ДНК. ДНК в концентрации до 0,7 мг/мл в реакционной смеси не мешает определению, т. е. допустимо соотношение ДНК : белок$\geqslant$10 : 1.

Окраска развивается менее чем за 5 мин и сохраняет стабильность 2,5 ч (для семи изученных белков); в случае лизоцима наблюдалось за это время падение интенсивности окраски на 11%. Чувствительность составляет 1/16 чувствительности метода Лоури, но существенное преимущество состоит в том, что зависимость поглощения от количества белка линейна, а влияние природы белка менее существенно. На реакцию не влияет присутствие в растворе NaCl (1,5 *М*), ацетата натрия (0,1 *М*), формиата натрия (0,75 *М*), хлорной кислоты (0,67 *М*) или Na_2H-фосфата (0,01 *М*). При концентрации мочевины >2,0 моль/л требуется ввести небольшую поправку на поглощение мочевины.

Предложен интересный метод, в котором белок обрабатывается сначала биуретовым реагентом, а затем реагентом Фолина. Получена хорошая воспроизводимость результатов (±2% для концентрации белка 50—600 мкг/мл). В координатах Хилла [284] кривая поглощения от концентрации белка преобразуется в прямую.

8.18.3.2. Биуретовый метод для образцов, содержащих тиолы [291].

Реагент. Растворяют 3,9 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и 6,7 Na_2-ЭДТА в 700 мл дистиллированной воды. Добавляют при постоянном перемешивании 200 мл 20%-ного NaOH до конечного объема 900 мл.

Методика. Раствор, содержащий 50—1000 мкг белка, в пробирке разбавляют до объема 0,1 мл, добавляют 1,0 мл биуретового реагента, инкубируют 5 мин при 60 °С и измеряют поглощение при 545 нм.

Замечание. Метод не очень чувствителен (~50 мкг), но прост и дает линейную зависимость поглощения от концентрации вплоть до 1000 мкг белка. Окраска стабильна в течение не менее 1 ч. Добавление иодоацетамида (12,5 мкг) необходимо для исключения влияния больших количеств дитиотреита. Реагент ЭДТА [66] превосходит по хелатирующей способности тартрат [129], что позволяет полностью исключить влияние сульфгидрильных соединений.

Комплекс меди с диэтилдитиокарбаматом в присутствии дезоксихолата давал линейный график для БСА при концентрации белка до 500 мкг/мл [185].

8.18.3.3. Биуретовый метод в применении к образцам, содержащим детергенты [393].

Реагент. 1,5 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$+4,9 г дигидрата Na_2-тартрата+7,5 г NaOH в 1 л воды. Реагент стабилен в течение 4 мес при хранении в пластиковом сосуде при комнатной температуре.

Методика. К 2,5 мл биуретового реагента добавляют 0,5 мл раствора, содержащего 0,2—0,4 мг белка и 2% детергента. Смешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Измеряют поглощение при 540 нм против 0,5 мл 2% раствора детергента.

Модифицированный реагент позволяет избежать помутнения раствора в случае присутствия детергентов, используемых для экстракции белков. Для БСА в диапазоне 0,4—8 мг/мл сохраняется линейная зависимость поглощения от содержания белка.

8.18.3.4. Биуретовый метод в применении к образцам, полученным экстракцией тканей [24].

Методика. Используется реагент, описанный в разд. 8.18.3.3 [393.]

Водный экстракт тканей промывают 3 мл смеси ацетон — петролейный эфир (1 : 1) при температуре 35—60 °С с перемешиванием на вибраторе 30 с. Центрифугируют и декантируют. К остатку добавляют 0,1 мл 10%-ного дезоксихолата (pH 8,0) и 2,9 мл реагента. Закрывают пробирку парафильмом и смешивают растворы, переворачивая осторожно пробирку. Озвучивают дважды по 15 с при 20 кГ источником ультразвука Branson Sonifier. Для максимального развития окраски помещают пробирку в кипящую водяную баню на 30 с. Охлаждают до комнатной температуры и измеряют поглощение при 540 нм против контрольного раствора реагентов.

8.18.4. Определение белка с помощью кумасси бриллиантового голубого

8.18.4.1. Метод Бредфорда [38].

Реагент — раствор красителя. Растворяют 100 мг кумасси бриллиантового голубого G-250 (фирма Sigma) в 50 мл 95%-ного этанола. К раствору добавляют 100 мл фосфорной кислоты (85%, масс./об.) и доводят до 1 л дистиллированной водой. Фильтруют. Хранят при 20 °С в течение 2 нед. Реагент поставляют фирмы Bio-Rad и Pierce.

Методика. Раствор белка (10—100 мкг) помещают в пробирку (12×100 мм) и разбавляют до 0,1 мл 0,15 М раствором NaCl. Добавляют 5 мл раствора красителя и перемешивают на вибромешалке. Через 2 мин начинают снимать кривую поглощения (при 595 нм) против контрольного раствора (0,1 мл соответствующего буфера+1 мл раствора красителя); измерения продолжают в течение ~1 ч.

Можно работать с пробами, содержащими 1—10 мкг в 0,1 мл буфера; при этом добавляют 1 мл раствора красителя. Измерение проводят в кювете объемом 1 мл.

Кюветы следует промывать соответствующим детергентом, водой и ацетоном для удаления комплекса белка с красителем, образующим пленку на стеклянной поверхности, или вымачивать в течение ночи в 0,1 М HCl.

Замечание. Описанный метод характеризуется в ~4 раза более высокой чувствительностью, чем метод Лоури. Окраска стабильна (±4%) в течение 1 ч. Катехоламины (как и хлориды натрия, калия, магния, сульфат аммония, этанол) не мешают определению, что позволило применить его к анализу фракций белков надпочечников [306]. В незначительной степени на результаты оказывают влияние буферные компоненты со щелочными свойствами, трис, уксусная кислота, 2-меркаптоэтанол, сахароза, глицерин и следовые количества детергентов; это влияние может быть компенсировано путем введения соответствующих добавок в контрольный раствор. Более подробно о мешающих корректному определению белка соединениях см. работу [350].

Достоинства метода Бредфорда заключаются в быстроте анализа и воспроизводимости результатов, но не всегда графики зависимости поглощения при 595 нм от количества белка линейны и угол наклона кривой для разных белков сильно варьирует [289, 377]. Поэтому график, полученный для белка-стандарта, может быть неприменим без соответствующих поправок к неизвестному белку. Наиболее достоверные результаты [303] дает измерение поглощения белка при 280 нм (при концентрации белка >50 мкг/мл) или 205 нм (при концентрации белка <50 мкг/мл).

При тщательном изучении метода Бредфорда [350] было найдено, что коэффициент экстинкции комплекса краситель — белок остается постоянным при концентрации белка 0,8—10 мкг/мл, поэтому рекомендуется выбирать объем раствора красителя (0,5—5,0 мл) таким образом, чтобы конечная концентрация белка оказывалась в указанных пределах. Это обеспечивает выполнение закона Бера (линейность зависимости) и позволяет осуществить точное определение белка при содержании 0,5—50 мкг.

Белки в концентрации менее 2 мкг/мл определялись с помощью кумасси R (фирма Sigma). Белок осаждали на стеклянно-фибровый диск, промывали трихлороуксусной кислотой, обрабатывали реагентом кумасси и образовавшийся окрашенный комплекс растворяли в метанольном растворе NaOH для колориметрического определения при 590 нм [249]. Применение щелочи, рекомендуемое для снятия осажденного белка с подложки, улучшает последующее колориметрическое или радиометрическое измерение [101].

Метод Бредфорда может быть применен к белкам, растворенным в электрофоретическом буфере, содержащем ДСН, меркаптоэтанол, трис. В этих условиях БСА дает линейную зависимость (в диапазоне 10—90 мкг белка), аналогичную получаемой в методе Лоури; в применении к анализу клеточных гомогенатов оба метода дали воспроизводимые, но различные по углу наклона графики [323].

8.18.4.2. Микровариант метода Бредфорда [46]. Образцы белка по 100 мкл (например, фракции элюата с ВЭЖХ) или растворы белков-стандартов помещают в ячейки плашки для микротитрования, приливают к ним по 200 мкл раствора красителя, разбавляют водой (1 : 5). Энергично встряхивают и через 10 мин измеряют поглощение при 595 нм (спектрофотометр фирмы Titertek Multiskan, фильтры фирмы Flow Labs. Inc.).

8.18.5. Определение белка с помощью сульфобромофталенина [248]

Реагент. Смешивают 2,0 мл 1 М HCl, 0,5 мл 1 М лимонной кислоты и 10 мкл раствора динатриевой соли сульфобромофталеина (фирма Baker Chemical) с концентрацией 50 мг/мл воды.

2 М NaOH, содержащий 1 мг/мл дезоксихолата натрия (ДОХ).

Раствор для промывки: смесь 1 *М* HCl+1 *М* лимонной кислоты+1 *М* $NaOH$ (4 : 1 : 2).

Методика. В 1,5 мл полипропиленовую центрифужную пробирку помещают образец белка (10 мкл) в воде или буфере. Добавляют такой же объем 2 *М* $NaOH$, содержащий ДОХ. Смешивают и оставляют на 1 ч при комнатной температуре (если это необходимо для полного растворения белка). Добавляют 50 мкл реагента, смешивают и центрифугируют (в центрифуге Eppendorf Model 3200 при полной скорости, ~12 000 g) в течение 1 мин. Удаляют несвязавшийся краситель пипеткой. Добавляют 0,5 мл раствора для промывки. Центрифугируют в этих же условиях и супернатант отбрасывают. Осадок суспендируют в 0,5 мл 0,1 *М* $NaOH$ на вибраторе и измеряют поглощение при 580 нм. Линейная зависимость наблюдается в диапазоне 0,5—10 мкг белка, при повышении концентрации красителя до 250 мкг/мл линейность сохраняется до 100 мкг белка.

Замечание. Методика не работает в присутствии тритона Х-100 (0,1%) и ДСН (0,1%), взаимодействующих с красителем. Воспроизводимость результатов ухудшается при использовании настольной центрифуги, дающей ~2000 *g*. Возможны перерывы между стадиями во времени. Метод рекомендуется для определения белка в тканях.

8.18.6. Определение белка с тринитробензолсульфокислотой в присутствии липидов [258]

Реагенты.

5%-ный раствор ДСН (масс./об.) в воде.

2,4,6-Тринитробензосульфокислота (ТНБС) (фирма Eastman, белая маркировка) может быть перекристаллирована из 1 *М* HCl. Готовят 0,03 *М* раствор в смеси *трет*-бутанол — *втор*-бутанол (9 : 1). Раствор можно хранить 2 мес при 0—2 °С.

Хлороформ или диэтиловый эфир.

Муравьиная кислота 98%.

Методика. Образец белка (0,04—0,5 мкг) обрабатывают 20 мкл 5%-ного ДСН и высушивают в потоке газа (N_2, CO_2 или воздух). Добавляют 1 мл 0,1 *М* калийтетрабората и перемешивают в вибраторе. Приливают 0,2 мл раствора ТНБС и снова перемешивают. Выдерживают 30 мин при 24—26 °С (10 мин при 40 °С), периодически встряхивая (можно использовать вибратор). Добавляют 3 мл хлороформа или диэтилового эфира, немедленно смешивают и центрифугируют 1 мин при 1000 *g*. Органическую фазу, содержащую липиды и другие примеси, отбрасывают. Подкисляют водную фазу 0,2 мл HCl. Повторно экстрагируют 3 мл хлороформа или эфира и отбрасывают органическую фазу. Добавляют 2,0 мл 98%-ной муравьиной кислоты и нагревают при 100 °С 20 мин. По охлаждении окрашенного в желтый цвет раствора измеряют оптическую плотность при 345 нм.

Замечание. Стандартами служат овальбумин или БСА. Ошибка определения ~10%. Другие методики определения белка в присутствии липидов не дают достоверных результатов. Аналогичный метод был разработан для определения аминов, аминокислот, белков в смеси [257] и свободных аминогрупп в белках [136]. Реакция аминокислот и пептидов с ТНБС использовалась для их детекции при ВЭЖХ [381].

8.18.7. Метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии

Метод позволяет определять белки в окрашенных или опалесцирующих растворах [92].

Реагент. 10 мл 0,20 *М* $CuSO_4$ добавляют к 590 мл 0,167 *М* $NaOH$, содержащего 2 г тетрагидрата Na,K-тартрата. Ионообменная смола AG2-X8.

Таблица 8.3. Определение количества белка по сравнению оптических плотностей при 280 и 260 нм

$A_{280/260}$	Нуклеиновая кислота, %	F
1,75	0,0	1,116
1,52	0,5	1,054
1,36	1,0	0,994
1,16	2,0	0,899
1,03	3,0	0,814
0,939	4,0	0,743
0,874	5,0	0,682
0,822	6,0	0,632
0,784	7,0	0,585
0,753	8,0	0,545
0,730	9,0	0,508
0,705	10,0	0,478
0,645	14,0	0,377
0,595	20,0	0,278

Атомно-абсорбционный спектрофотометр Varian-Techtron, модель 1000 с воздушно-ацетиленовым пламенем.

Методика. Приливают 1 мл Cu-реагента к 1 мл раствора белка (0,05—1,0 мг/мл). Смешивают. Через 2—5 мин добавляют 250 мг смолы и периодически встряхивают в течение 5 мин. После отстаивания смолы отбирают 1 мл супернатанта и добавляют к 3 мл дистиллированной воды. Определяют содержание меди на атомно-абсорбционном спектрофотометре при 324,8 нм. Готовят контрольный раствор реагентов и строят градуировочный график для БСА (0,05—1,0 мг/мл). Для уменьшения приборных шумов и предохранения прибора от блокировки в промежутках между измерениями образцов распыляют 0,5 мл ледяной уксусной кислоты. Присутствие хлорофилла, гема, рутения и других кофакторов не мешает определению. Метод привлекается, если неприменимы другие методы. Раствор белка должен содержать <0,4 М солей или аминокислот. Нерастворимые белки могут быть переведены в раствор с помощью 1% (масс./об.) ДСН.

8.18.8. Спектрофотометрические методы

8.18.8.1. Сравнение поглощения при 280 и 260 нм. Большинство белков имеет максимум поглощения при 280 нм, что обусловлено содержанием в них остатков триптофана и тирозина. Нуклеиновые кислоты, присутствующие часто в виде примесей к белкам, также сильно поглощают при 280 нм, но максимум поглощения этих соединений находится при 260 нм. Барбург и Христиан экспериментально определили коэффициенты экстинкции различных белков и нуклеиновых кислот при 280 и 260 нм и нашли отношение этих коэффициентов (фактор F; табл. 8.3); предложен дифференциальный метод определения белка в интервале концентраций 50—500 мкг/мл.

Метод Варбурга и Христиана [388]. Измеряют оптическую плотность белкового раствора при 280 нм и 260 нм. Вычисляют

отношение полученных величин, по табл. 8.3 находят соответствующее значение F и подставляют в следующую формулу:

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = F \cdot 1/d \cdot A_{280}$$

[где d — длина кюветы (в см)] или [212]:

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = 1{,}55A_{280} - 0{,}76A_{260}$$

8.18.8.2. Сравнение поглощения при 230 и 260 нм [194].

$$\text{Концентрация белка (мкг/мл)} = 183A_{230} - 75{,}8A_{260}$$

Эти длины волн были выбраны потому, что они соответствуют минимальному и максимальному поглощению в спектре нуклеиновых кислот. Небольшие отклонения в установке длины волны практически не оказывают влияния на определение нуклеиновых кислот, но поглощение белков при ~230 нм меняется на 1% при изменении длины волны на 0,1 нм. Высокие концентрации сульфата аммония, глицерина, сахарозы, мешающие определению в методе Лоури, можно нивелировать соответствующими добавками в «холостом» опыте.

8.18.8.3. Сравнение поглощения при 235 и 280 нм [399].

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = (A_{235} - A_{280})/2{,}51$$

Замечание. Нуклеиновые кислоты не дают вклада в результаты, поскольку имеют одинаковое поглощение при 235 и 280 нм. На основе данных аминокислотного состава 208 белков была найдена средняя суммарная величина поглощения остатков Trp, Tyr, Phe, His, Met, Cys-Cys и Cys, она составила 0,853, а для 8 изученных белков — 0,849.

Чувствительность определения концентрации белка при A_{235} в 2,82 раза выше, чем при A_{280}. Чувствительность метода в целом составляет 45% таковой для метода Лоури.

Еще один метод определения основан на измерении величины отношения A_{233}/A_{240} [133].

8.18.8.4. Сравнение поглощения при 215 и 225 нм [383]. Делают серию разбавлений раствора белка и измеряют поглощение образцов.

$$\text{Концентрация белка (мкг/мл)} = (A_{215} - A_{225}) \cdot 144$$

Замечание. NaCl и $(NH_4)_2SO_4$ не мешают определению [271], некоторые буферы, например ацетатный, цитратный, барбитуратный, сукцинатный, фталатный, сильно поглощают при 215 нм, но могут быть использованы в низкой концентрации (0,005 моль/л), если при этом делается поправка на контрольный опыт. Критическая оценка метода дана в работе [407]; он

рекомендован к использованию как для чистых белков, так и для смесей в диапазоне концентраций 1,5—45 мкг/мл, где сохраняется линейная зависимость.

8.18.8.5. Сравнение поглощения при 280 и 205 нм [335]. Раствор белка разбавляют 0,1 М K_2SO_4, содержащим 5 мМ KH_2PO_4, с pH 7,0 (добавление KOH). Поглощение этого буфера при 205 нм составляет 0,08 ед. опт. пл./см и зависит от содержания CO_2. Адсорбционные потери белков сводятся к минимуму при приготовлении растворов в полиэтиленовых сосудах. Кварцевые кюветы должны быть очищены концентрированной азотной кислотой и сделана соответствующая поправка на светорассеяние в дальнем ультрафиолете.

Наибольший вклад в поглощение при 205 нм дают боковые цепи остатков Trp, Tyr, Phe, His и в меньшей степени остатки Arg, Met и Cys. Поправка для Trp и Tyr (для других аминокислот в большинстве случаев этого не делают) определяется путем измерений (на образце с большей концентрацией) поглощения при 280 нм.

$$\varepsilon_{205} = 27{,}0 + 120 \cdot (A_{280}/A_{205})$$

Замечание. При количественном определении 12 белков спектрофотометрическим методом найдено $\varepsilon_{280} = 0{,}50 \div 2{,}65$ и $\varepsilon_{205} = 29{,}0 \div 36{,}4$. Лишь в случае необычно высокого содержания Phe в образце ошибка измерения достигала более $\pm 2\%$ [335].

Для анализа белков при 205 нм требуется спектрофотометр высокого класса и следует иметь в виду, что из раствора должны быть исключены даже следовые количества соединений, поглощающих в этой области ($HCOOH$, CH_3COOH, CH_3COCH_3 и др.).

8.19. Методы окрашивания белков в гелях

Впервые окрашивание комплексами серебра разделенных в электрофоретических гелях белков было применено в 1972 г. [197], но потенциальные возможности этого метода были открыты позднее [359]. Методы окрашивания белков комплексами серебра в 100—200 раз более чувствительны, чем основанные на применении кумасси бриллиантового голубого. Из шести предложенных методик с этим реагентом наилучшие характеризовались пределом обнаружения 0,5 нг белка/$мм^2$ поверхности ПААГ [282]. Чувствительность окрашивания комплексами серебра несколько варьирует в зависимости от свойств и природы белка, как показано в сравнительном исследовании четырех различных методик применительно к белкам секрета околоушной железы человека, причем выбор оптимального варианта

окрашивания во многом определяет корректность интерпретации результатов [115]. Электрофореграммы, окрашенные кумасси и комплексами серебра, часто отличаются друг от друга, а некоторые белки, как, например калмодулин и тропонин С, обнаруживаются с помощью кумасси, но не проявляются комплексами серебра. Было найдено, что такого рода белки требуют для окрашивания серебром предварительной обработки глутаровым альдегидом, а соответствующая процедура отмывки электрофореграмм должна проводиться под строгим контролем во избежание потерь растворимых белков [328]. Основные белки менее чувствительны к окрашиванию комплексами серебра, чем нейтральные, и для них предложены методы двойного проявления — кумасси и солями серебра [176].

С помощью комплексов серебра удалось обнаружить пептиды в ДСН — ПААГ, полученные из нанограммовых количеств белка [222]. В работе сделан вывод, что метод более быстр, дешев и безопасен, чем радиоактивное мечение и приготовление авторадиограмм или флуорограмм. Были использованы коммерческие наборы реагентов фирмы Upjohn Diagnostics для гелей толщиной 1,5 мм [324] и рекомендован для окрашивания более тонких гелей по методике, описанной в работе [408] (набор фирмы Bio-Rad).

Механизм взаимодействия комплексов серебра с белком включает участие в нем фосфатных [326], сульфгидрильных и карбоксильных групп аминокислот [286]. Чувствительность обнаружения белков реагентом повышалась после предварительной обработки их глутаровым альдегидом [281] или формальдегидом [408], а также в случае предварительного восстановления дитиотреитом [269]. В работе [99] сделан вывод, что усиление чувствительности метода происходит только при обработке глутаровым альдегидом (но не формальдегидом) и что интенсивность окраски линейно коррелирует с числом остатков лизина в белке.

Первоначальный вариант метода [252, 359] был модифицирован многими исследователями с целью сделать его более простым и дешевым [175, 253—255, 269, 281, 305, 324, 408]. См. критический обзор [305].

Окрашивание комплексами серебра — первый надежный метод обнаружения гистонов в гелях, содержащих тритон, кислоту и мочевину, с близкой к линейной зависимостью интенсивности окраски от количества белка при его содержании 0—50 нг [259].

Было показано, что помещение ПААГ-электрофореграммы последовательно в гипер- и гипотонический растворы дает возможность обнаруживать с помощью комплексов серебра 10 фг белка [285]. В то же время в исходном варианте процедура окрашивания солями серебра многостадийна, трудо-

емка, включает много ручных операций. Неполное удаление непрореагировавших комплексов серебра может привести к образованию сильноокрашенного фона. Продолжительная процедура отмывки электрофореграмм в потоке жидкости позволяет избежать этих осложнений и получить, как было показано на мышечном белке, линейную зависимость в диапазоне 2—70 нг образца в полосе геля [126]. Предложена новая техника микроволновой сушки ПААГ [124], позволяющая осуществить этот процесс за 3,5 мин (вместо обычных 35—45 мин) при толщине геля 0,75 мм и за 1 ч при толщине в 3 мм (аппарат для сушки Bio-Rad делает это за 4—5 ч).

8.19.1. Методы окрашивания белков красителями

Окрашивание белков в гелях с помощью красителей уступает по чувствительности описанным выше методикам с применением комплексов серебра, но его проще осуществлять в повседневной практике. Наиболее широко используется краситель кумасси бриллиантовый голубой, но существует и много других модификаций метода. Окрашенные кумасси полосы белков могут быть сфотографированы при освещении лампой дневного света на поляроидную пленку типа 665 (фокусное расстояние 32, экспозиция 0,5 с) с желтым светофильтром [353].

1. Окрашивание ПААГ красителем кумасси R250 (0,1%, масс./об., фирма Serva) в смеси 50%-ный метанол — 12%-ная уксусная кислота в течение ночи при легком помешивании. Обесцвечивание несколькими объемами раствора 10%-ный этанол — 5%-ная уксусная кислота. Фотографирование через узкополосный (550 нм) интерференционный светофильтр (фирма Baird Atomic, Bedford, MA) [253]. При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДСН белков, прочно связанных с ДНК, были обнаружены две артефактные полосы (соответствующие молекулярным массам $54 \cdot 10^3$ и $68 \cdot 10^3$), окрашиваемые кумасси и комплексами серебра; в буфере присутствовал меркаптоэтанол [364].

2. Окрашивание ПАА-гелей в течение ночи кумасси R250 (0,2% масс./об.) в смеси 45%-ный метанол — 10%-ная уксусная кислота, обесцвечивание раствором 10%-ный метанол — 7%-ная уксусная кислота [317]. После электрофореза агарозные гели смачивались дистиллированной водой, обертывались фильтровальной бумагой и выдерживались 30 мин при 37 °С. Окраска проявлялась через 15 мин после обработки кумасси R250 (0,1%, масс./об.) в смеси 45%-ный этанол — 10%-ная уксусная кислота. Обесцвечивание той же смесью растворителей.

3. Обнаружение с помощью кумасси белков и полипептидов после изоэлектрофокусирования [370]. Кумасси бриллиантовый голубой R250 не может быть использован в обычных условиях

для обнаружения белков на ПААГ после изоэлектрофокусирования, поскольку носители-амфолиты (полиаминополикарбоновые кислоты) реагируют с красителем. Для преодоления этих ограничений было предложено использовать коллоидные суспензии кумасси R250 и G250 в хлорной [311] и трихлороуксусной [26, 313] кислотах. Приведенная ниже методика дает хорошие результаты.

После изоэлектрофокусирования полосу геля толщиной 0,5 мм опускают на 3 ч в водный 0,15%-ный раствор кумасси G250, содержащий 40% метанола и 4% формальдегида. Обесцвечивают в течение ночи 10%-ным метанолом путем смены нескольких объемов промывного раствора. Слабый голубой фон остается, но он не мешает определению. Фотографируют при освещении лампой дневного света на поляроидную пластинку типа 665 с оранжевым светофильтром, фокусное расстояние 8, экспозиция 1/8 с.

Метод применим к ПААГ-системам, содержащим ДСН и 8 М мочевину. Полипептиды и белки (*М* 1665—68 000) с изоэлектрическими точками при pH 2,2—10,2 были разделены изоэлектрофокусированием в градиенте pH 3,5—10,5. Чувствительность обнаружения для тридекапептида α-меланостимулирующего гормона составила 20 мкг.

4. Окрашивание кумасси в процессе электрофореза [379]. Метод позволяет осуществить окрашивание в процессе электрофореза в кислых гелях и применялся в основном для обнаружения гистонов. Добавляют кумасси R250 (0,01%, масс./об.) к катодному буферу и ведут электрофорез в 0,9 М уксусной кислоте (pH 2,5) при нагрузке 4 мА на одну гелевую трубку и 100 В до достижения красителем верхнего края геля. Обесцвечивают в течение короткого времени (2—3 ч) для обнаружения минорных полос.

5. Для обнаружения гистонов на ПААГ была использована следующая методика.

Перед окрашиванием солями серебра погружают гель на 3 ч в 500 мл раствора, содержащего 1% амидочерного, 40% метанола и 7% уксусной кислоты. Обесцвечивают в течение ночи в 4 л смеси 32%-ный этанол — 18%-ная уксусная кислота и затем промывают 4 раза по 1 л воды [259].

В альтернативном варианте при легком размешивании выдерживают гель в течение 3 ч (не более) в растворе, содержащем 0,05% 2,7-нафталиндисульфокислоты (фирма Eastman), 50% метанола и 10% уксусной кислоты. Обесцвечивания не требуется.

8.19.2. Окрашивание белков комплексами серебра

Внимание! Аммиачные комплексы серебра взрывоопасны и не подлежат хранению. Отработанные растворы комплексов надо обрабатывать HCl для разрушения и разбавлять водой перед удалением.

Для регенерации серебра добавляют насыщенный раствор NaCl, жидкость отделяют путем фильтрования и отбрасывают; собирают осадок AgCl [408].

После окрашивания серебром можно осуществлять непрерывную регистрацию результатов с помощью фотографирования на поляроидную пленку (3×5″) или негативную пленку (впоследствии с нее печатают фотографии). Описан метод с использованием пленки прямого копирования (Kodak X-Omat) при УФ-освещении в течение 1—1,5 с с последующей обработкой проявителем и закрепителем фирмы Kodak. Процедура неприменима к образцам, окрашенным кумасси [125].

8.19.2.1. Фотопроявление белков на ПААГ.

Методика А [253]. Для визуального обнаружения белка необходимо всего <50 мин.

1. После электрофореза фиксируют белок в течение 10 мин в растворе, содержащем 50% метанола и 12% уксусной кислоты.

2. Промывают гель дважды смесью 10%-ный этанол — 5%-ная уксусная кислота.

3. Вымачивают гель в 0,5%-ном растворе ферро(II)цианида калия в течение 5 мин при легком встряхивании.

4. Сливают раствор и промывают гель трижды водой (20 с на каждую промывку).

5. Добавляют раствор, содержащий 0,2 г нитрата серебра, 0,2 г нитрата аммония, 0,5 мл 37%-ного формальдегида (фирма Fischer Scientific) и 0,06 мг бензотриазола в 100 мл воды.

6. Освещают гель в течение 20 мин в блоке флуоресцентной лампой 160 Вт, модель Т-12 (фирма Aristo Grid Products) с интенсивностью эмиссии, эквивалентной эмиссии вольфрамового источника света мощностью 500 Вт.

7. Сливают раствор нитрата серебра, и без промывки геля добавляют 200 мл 3%-ного раствора карбоната натрия, содержащего 37% формальдегида и 0,6 мг бензотриазола/л. Продолжают освещение при легком встряхивании. Через 1 мин образуется коричневый осадок и раствор карбоната натрия заменяют на свежий. Процесс заканчивают при достижении необходимой интенсивности окраски.

8. Окрашивание может быть прервано в любую минуту удалением раствора карбоната натрия и вымачиванием геля (5 мин) в 1%-ной уксусной кислоте.

9. Перед хранением гель промывают водой.

Методика Б [256]. Методика позволяет обнаруживать белки и нуклеиновые кислоты в течение 10 мин.

1. Фиксируют гель выдерживанием 5 мин в смеси метанол — уксусная кислота — вода (100 : 20 : 80), содержащей 4 г лимонной кислоты и 0,4 г NaCl.

2. Обмывают гель 200 мл деионизованной воды для удаления NaCl.

3. Помещают гель в 200 мл смеси метанол — уксусная кислота — вода (100 : 20 : 80), содержащей 4 г нитрата серебра, и освещают, как описано в методике А.

Делают серию фотографий в процессе проявления (для количественного анализа каждые 10 мин).

4. Останавливают окрашивание путем помещения геля в темноту. Чувствительность 0,5 нг белка. ДНК дает негативное окрашивание.

8.19.2.2. Полиакриламидные гели.

Методика [242].

Реагенты для окрашивания солями серебра. Раствор комплекса. Смешивают (1 : 5) 30%-ный раствор метиламина (продажный) с раствором NaOH (0,36%, масс./об.) и добавляют ~10 мл этого раствора к 4 мл 20%-ного

(масс./об.) $AgNO_3$ до образования коричневого осадка и просветления раствора. Доводят общий объем до 100 мл водой. Надо соблюдать меры предосторожности; см. разд. 8.19.2.

Проявитель. Добавляют 15 мл раствора, содержащего 1% (масс./об.) лимонной кислоты и 1,5 мл 40%-ного (продажного) формальдегида к 3 л воды.

Реагенты для обесцвечивания.

А. Растворяют 11,1 г $NaCl$ и 11,1 г $CuSO_4$ в 285 мл воды и прибавляют 25%-ный раствор аммиака до выпадения осадка и просветления темно-голубого раствора (конечный объем ~300 мл).

Б. Растворяют 44 г тиосульфата натрия (пентагидрат) в 85 мл воды (конечный объем ~100 мл).

В. Осветляющий реагент фирмы Kodak: 20 г в 800 мл воды.

Методика окрашивания.

1. Вымачивают ПААГ (0,8—3,0 мм толщиной) после электрофореза в течение ночи в растворе 50%-ный метанол+10%-ная уксусная кислота (100 мл).
2. Промывают при 60 °С в течение 10 и 20 мин, сменяя несколько раз воду (200 мл).
3. Инкубируют 30 мин при 60 °С в 0,1%-ном (масс./об.) растворе формальдегида (200 мл), приготовленного добавлением 2,5 мл 40%-ного формальдегида к 1 л воды.
4. Охлаждают до комнатной температуры 10 мин в воде (200 мл).
5. Встряхивают 10 мин при комнатной температуре в растворе комплекса серебра (200 мл).
6. Сливают раствор комплекса и быстро ополаскивают гель двумя объемами воды и проявителя (каждый раз по 100 мл).
7. Выдерживают гель в течение 30 мин в проявителе, сменяя раствор каждые 5 мин, до почернения фона в результате реакции «серебряного зеркала». Полосы белка постепенно (5—25 мин) становятся интенсивно окрашенными.
8. Промывают гель 10 и 20 мин двумя сменами холодной воды и вымачивают ночь в свежей порции воды.

Методика обесцвечивания. Смешивают реагенты *А* и *Б* в пропорции 3 : 1 и разбавляют равным объемом воды. Инкубируют гель в этом растворе (100 мл) 1—4 мин, пока фон не пожелтеет. Быстро споласкивают водой и погружают на 30 мин в реагент *В* (100 мл). Промывают тремя объемами воды (выдерживая соответственно 10, 20 и 30 мин).

Замечание. В основу метода положены ранние работы [241, 244]. Метод дает высокую чувствительность (0,01 нг БСА/мм^2) благодаря использованию низкой концентрации формальдегида и процедуре интенсивного окрашивания с последующим обесцвечиванием. Двумерным электрофорезом в сочетании с этим методом было разделено и обнаружено более 200 пептидов из 30 мкл мочи и более 150 — из одного отпечатка пальца. См. также работу [243], где применялось окрашивание комплексами серебра белков из слюны человека.

8.19.2.3. Крупнопористые ПААГ [295, 244]. Крупнопористые гели используются для электрофоретического фракционирования макромолекул с молекулярными массами $>10^6$. Агарозные гели становятся темными при обработке комплексами серебра, поэтому описанная выше методика окрашивания не может быть к ним применена [35]. Ниже приводится методика окрашивания крупнопористых гелей, приготовленных на основе 2,55%-ного полиакриламида с 2,75% сшивок с метиленбисакриламидом.

Методика.

1. После электрофоретического разделения белков гель вымачивают в течение 1 ч в смеси 37%-ный формальдегид (фирма Fluka) — этанол — вода (15 : 27 : 63) и затем оставляют на ночь в смеси другой концентрации указанных компонент (1 : 25 : 75).

2. Встряхивают гель при 60 °С в растворе метанол — уксусная кислота — вода (5 : 7 : 88) по крайней мере 4 ч со сменой раствора каждые 20—30 мин.

3. Встряхивают гель при 60 °С 15 мин со свежим раствором 4%-ного масс./об.) параформальдегида (фирма Merck) в 1,43%-ном (масс./об.) какодилате натрия (фирма Fluka), pH 7,3.

4. Промывают гель при 60 °С дистиллированной водой не менее 3 ч, сменяя воду каждые 20—30 мин.

5. Помещают гель в раствор комплекса серебра (разд. 8.19.2.2) на 10 мин при комнатной температуре.

6. Ополаскивают водой 2—3 мин.

7. Проявляют свежеприготовленным водным раствором лимонной кислоты (0,005%, масс./об.; фирма Merck) и формальдегида (0,019, масс./об.; фирма Merck), постоянно меняя раствор, до появления темных полос белка.

8. Прекращают окрашивание добавлением метанола (5%).

8.19.2.4. Агарозные гели после изоэлектрофокусирования. Метод окрашивания комплексами серебра в течение 10 мин в 20 раз более чувствителен, чем окрашивание кумасси R250, и может применяться после окрашивания красителем [211].

Фиксация и высушивание. После изоэлектрофокусирования белки в гелях фиксируют погружением на 10 мин в раствор 10%-ная трихлоруксусная кислота — 1%-ная сульфосалициловая кислота. Промывают 10 мин 95%-ным этанолом. Сушат в потоке теплого воздуха.

Авторадиография. Для изотопов с низкой энергией используют пленку Ultrofilm [^{3}H] LKB 2208-190 с обработкой ее проявителем LX24 и закрепителем AL4 для рентгеновской пленки Kodak.

Окрашивание кумасси. Погружают гель на 5 мин в раствор, содержащий 35% этанола, 10% уксусной кислоты и 0,6% кумасси R250. Обесцвечивают 10 мин смесью 35%-ный этанол — 10%-ная уксусная кислота.

Окрашивание комплексами серебра.

1. После фиксации гель помещают на 5 мин в раствор, содержащий 50% метанола, 12% трихлороуксусной кислоты, 2% $CuCl_2$ и 1% $ZnCl_2$ и высушивают.

2. Погружают гель в смесь (1 : 2) 0,01%-ного $KMnO_4$ и гистологического красителя Харриса гематоксилина (фирма Chroma 2E 0565). Состав красителя: 10 мл этанола + 1 г гематоксилина + 20 г калий-аммонийфосфата + 0,5 г желтого оксида ртути.

3. Ополаскивают гель в дистиллированной воде (несколько секунд), при этом оранжевая окраска бледнеет и переходит в розово-лиловую.

4. Приготовление растворов. *А.* 8 г безводного карбоната натрия в 100 мл дистиллированной воды (готовится ежедневно). *Б.* Растворяют в 80 мл воды (в указанном порядке) 0,28 г нитрата аммония, 0,2 г нитрата серебра, 1 г кремневольфрамовой кислоты ($SiO_2 \cdot 12WO_3 \cdot 26H_2O$) и 0,73 мл 35%-ного формаль-

дегида. Доводят объем до 100 мл (можно хранить в течение нескольких месяцев при комнатной температуре). Непосредственно перед использованием смешивают равные объемы растворов *А* и *Б* и погружают в эту смесь гель. В течение 1—3 мин полосы белка становятся красно-коричневыми, а затем черными.

5. Останавливают реакцию промыванием геля в дистиллированной воде в течение нескольких секунд.

Чувствительность метода 0,045 мкг белка в полосе геля. См. также в работе [380] окрашивание белков комплексами серебра в агарозных гелях.

8.19.2.5. Полиакриламидные и агарозные гели после обработки глутаровым альдегидом. Метод основан на одностадийном восстановлении серебра после обработки белка глутаровым альдегидом. Стадии промывки в описании опущены.

Реагенты. Раствор глутарового альдегида (фирма Merk-Schuchardt). Аммиачный комплекс серебра (0,2%-ный раствор, масс./об.): смешивают раствор NaOH (0,36 г в 21 мл воды), 1,4 мл NH_4OH (28%, масс./об.) и 1 мл нитрата серебра (20%, масс./об.) и доводят общий объем до 100 мл водой. Надо соблюдать меры предосторожности; см. разд. 8.19.2.

Полиакриламидные гели. После электрофореза фиксируют белок 30 мин в растворе 45%-ный метанол — 10%-ная уксусная кислота. Промывают водой для удаления органических растворителей. Помещают гель в 200 мл (1%, масс./об.) раствора глутарового альдегида и выдерживают при интенсивном размешивании 15 ч при комнатной температуре.

Важно строгое соблюдение концентрации глутарового альдегида, 1%-ный раствор пригоден для гелей размером 120×140 мм и 0,5%-ный — для гелей 30×45 мм при толщине 0,75—1,5 мм.

Переносят гель в раствор комплекса серебра на 30 мин. Интенсивное перемешивание предупреждает осаждение серебра на геле. Окраска фона может быть снята селективно в течение нескольких минут обработкой 10%-ной уксусной кислотой.

Промывают гель водой (или забуференным физиологическим раствором с pH 7,2, если использовалась уксусная кислота). Фотографируют. Хранят пластинки геля в пластиковых емкостях. Чувствительность 0,03 нг/мм^2 для БСА и 0,5 нг/мм^2 для овальбумина, т. е. в 100 раз выше, чем при применении кумасси.

Агарозные гели. После иммуноэлектрофореза агарозный гель увлажняют дистиллированной водой или физиологическим раствором, промокают фильтровальной бумагой и высушивают в течение 15 мин. Переносят в 100 мл раствора комплекса серебра на 5—10 мин. Окраску фона снимают, как описано выше. На всех стадиях используют интенсивное перемешивание.

Рекомендуемые концентрации глутарового альдегида

Антисыворотка в агарозе, содержание, % (об./об.)	Глутаровый альдегид, % (масс./об.)	Окрашивание зон
0,05—0,5	1	Негативное
>0,5—1	0,33	
0,05—0,25	3	Позитивное
>0,25—1	5	

8.19.2.6. Окрашивание комплексом серебра с последующим тонированием [23]. Интенсивность окрашенных полос белка может быть увеличена в 7—10 раз с помощью описываемой ниже обработки. Оценка методом денситометрии показала, что линейность зависимости интенсивности окраски от концентрации белка сохраняется в диапазоне 0,05—1,7 пмоль/мм^2.

Реагенты.

А. 5%-ный (масс./об.) раствор хлорида железа(II).

Б. 3%-ная (масс./об.) щавелевая кислота.

В. 3,5%-ный (масс./об.) раствор ферро(III)цианида калия.

Эти растворы можно хранить в течение нескольких месяцев при комнатной температуре.

Тонирующая ванна. Смешивают по 10 мл каждого из реагентов *А*, *Б* и *В* и добавляют 70 мл воды. Готовят непосредственно перед употреблением. Раствор должен быть коричневым, при возникновении зелено-голубой окраски не пригоден к употреблению.

Методика. Полиакриламидные гели окрашивают комплексом серебра [269], промывают проточной водой (под краном) по крайней мере 30 мин и затем помещают на 0,5—3 мин в тонирующий раствор. Полосы белков при этом становятся голубыми. После промывки в течение 10 мин водой (под краном) окраску стабилизируют вымачиванием 10 мин в смеси 20%-ный метанол — 5%-ная уксусная кислота; хранят гели в запаянных полиэтиленовых пакетах. Количественная оценка проводится при окрашивании солями серебра денситометрически при 550 нм и после тонирования спектрофотометрически при 660 нм на спектрофотометре Gilford Model 250. Фотографируют гели на пленку Panatomic film (фирма Kodak).

8.19.2.7. Двойное окрашивание кумасси и комплексом серебра [176]. Предварительная обработка кумасси с одновременной фиксацией формальдегидом повышает интенсивность окрашивания и облегчает идентификацию полос на геле.

Фиксация и обработка кумасси.

1. ПААГ после электрофореза погружают на 1 ч в раствор формальдегид — уксусная кислота — этанол — вода (5 : 10 : 25 : 60), содержащий кумасси R250 (0,05%, масс.об.), а затем на 3 ч или на ночь в раствор из тех же компонентов в соотношении 0,5 : 10 : 25 : 64, содержащий 0,05%-ный кумасси R250.

2. Сливают красящий раствор, промывают гель смесью уксусная кислота — изопропанол — вода (10 : 25 : 65), а затем смесью из тех же растворителей в соотношении 10 : 10 : 80 до осветления фона.

Окрашивание солями серебра (модифицированная методика) [252].

1. Промывают гель после фиксации 10%-ным водным раствором этанола для удаления уксусной кислоты.

2. Промывают в течение 30 мин смесью 4%-ный параформальдегид — 1,43%-ный (масс., об.) какодилат натрия (подкисление до pH 7,6 с помощью HCl).

3. Промывают 10%-ным этанолом 4 раза по 5 мин.

4. Выдерживают 30 мин в растворе нитрат меди — нитрат серебра (растворяют 3,5 г нитрата серебра в 100 мл воды и прибавляют 1,5 мл 0,5%-ного

(масс./об.) раствора меди, содержащего 4 мл пиридина и 8 мл абсолютного этанола).

5. Промывают 5 мин в свежеприготовленном растворе комплекса: смешивают 30 мл 19,4%-ного (масс./об.) раствора нитрата серебра и 22,2 мл щелочно-аммиачного водно-этанольного раствора (100 мл 0,36%-ного водного раствора NaOH+45 мл концентрированного аммиака+55 мл 20%-ного этанола).

6. Обрабатывают дважды по 1 мин раствором восстановителя: 2,5 мл 10%-ного формальдегида (готовят разбавлением продажного формальдегида водой, 1 : 10)+6 мл 1%-ной лимонной кислоты+100 мл этанола; доводят общий объем до 1 л водой. Затем ополаскивают несколько раз вторым раствором восстановителя: 5 мл 10%-ного формальдегида+5 мл 1%-ной лимонной кислоты+100 мл этанола; доводят общий объем до 1 л водой; обработку проводят до появления коричневых и черных полос белка на электрофореграмме.

7. Останавливают проявление путем погружения геля в 1%-ную уксусную кислоту. В этом растворе гель можно хранить в течение по крайней мере 2 мес; можно также высушить пластинки в вакууме при 100 °С на фильтровальной бумаге. Чувствительность 0,02—0,2 нг/мм^2 для нейтральных белков и ~1,0 нг/мм^2 для основных белков.

8.20. Окрашивание белков на нитроцеллюлозной бумаге

Процесс переноса электрофоретически разделенных белков на нитроцеллюлозную подложку известен под названием «блоттинг» [49]. Методы обнаружения основаны на применении амидочерного, индийских чернил и окрашивании комплексом серебра. Специфический иммуноанализ реактивных антигенов на нитроцеллюлозе впервые описан в 1979 г. [368] (см. также разд. 8.20.3).

8.20.1. Окрашивание амидочерным [405]

Окрашивают нитроцеллюлозные пластинки с иммобилизованным белком амидочерным (0,1%-ный раствор в смеси 45%-ного метанола и 10%-ной уксусной кислоты). Обесцвечивание проводят 2%-ной уксусной кислотой в 90%-ном метаноле. Чувствительность — 1 мкг белка.

8.20.2. Окрашивание с помощью индийских чернил [140]

Белки разделяются с помощью электрофореза в градиентных гелях (от 3,3 до 20%) и электрофоретически переносятся на нитроцеллюлозную бумагу (фирма Schleicher and Schuell) [373].

Нитроцеллюлозные полоски с белком промывают 4 раза по 10 мин в 250 мл 0,15 *М* NaCl в буфере 0,01 *М* Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (pH 7,2), содержащем 0,3% твина 20 (PSB-TW), при 37 °С в пластиковых водонепроницаемых боксах при легком перемешивании на водяной бане. После каждой промывки ополаскивают полоску деионизованной водой.

Для окрашивания используют чертежные чернила Pelikan Fount, India Ink и чернила для автоматических ручек (Pelikan AG, D-3000).

Добавляют к 200 мл исходного буфера чернила (1 мкл/мл) и погружают в раствор пластинку (180×200 мм) минимум на 2 ч, но лучше на ночь при перемешивании. Небольшое увеличение в интенсивности окрашивания дости-

гается добавлением 10% глутарового альдегида. Обесцвечивания не требуется, пластинку ополаскивают деионизованной водой 5 мин.

Чувствительность обнаружения зависит от природы белка и варьирует от 80 нг (β-галактозидаза) до 520 нг (овальбумин). Белки проявляются в виде светло-серых полос на желто-сером фоне. Гели можно хранить в указанном буфере в течение месяца без видимых изменений.

Индийские чернила дают лучшие результаты, чем другие красители (амидочерный, фаст-грин или кумасси) [250].

8.20.3. Обнаружение с помощью антител [405]

Перенесенные на нитроцеллюлозные пластинки белки обрабатывают 2,4-динитрофторобензолом. Образующиеся производные белка могут быть обнаружены в количестве 10 нг при обработке антителами к динитрофенильным (ДНФ) группам с помощью пероксидаза-антипероксидазного комплекса. Метод в 100 раз более чувствителен, чем окрашивание кумасси, и в то же время лишен осложнений, возникающих при использовании комплекса серебра.

Реагенты.

А. 50 мМ $NaHCO_3$ в 50%-ном диметилсульфоксиде.

Б. 0,14 М NaCl, забуференный 10 мМ Na-фосфатом, pH 7,2.

В. 3%-ный БСА — 10%-ный раствор инактивированной нагреванием сыворотки теленка в 0,14 М NaCl, забуференном 10 мМ Na-фосфатом pH 7,2.

Г. 50 мМ трис — HCl-буфер (pH 7,5), содержащий 0,3 мг/мл 3,3′-диаминобензидина и 0,005% H_2O_2.

Методика.

1. Выдерживают нитроцеллюлозную пластинку 10 мин при комнатной температуре в реагенте *А*, содержащем 0,00001—0,1% 2,4-динитрофторобензола. Более длительное время инкубации и более высокая концентрация реагента могут усложнить удаление его избытка. Промывают несколько раз реагентом *А*. Антигенные детерминанты определяются по методу [368], как описано ниже.
2. Промывают реплику реагентом *Б* (пять раз по 5 мин).
3. Выдерживают при легком встряхивании в течение 1 ч при 40 °С в реагенте *В*.
4. Инкубируют в течение ночи в антисыворотке кролика к ДНФ-группам, разбавленной (1 : 200) реагентом *В*.
5. Промывают пластинку реагентом *Б* (4 раза по 5 мин).
6. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре с антителами козы, к IgG кролика (фирма Serasource), разбавленными (1 : 40) реагентом *В*.
7. Промывают реагентом *Б* (4 раза по 5 мин).
8. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре с комплексом пероксидаза-антипероксидаза (фирма Miles), разбавленным (1 : 40) реагентом *В*.
9. Промывают реагентом *Б* (3 раза по 5 мин).
10. Погружают в реагент *Г* для обнаружения пероксидазной активности.

8.20.4. Обнаружение с помощью комплекса серебра и антител

Полосы белков с гелей переносят на нитроцеллюлозную бумагу и окрашивают комплексом серебра. В этих условиях сохраняются антигенные детерминанты и индивидуальный белок может быть обнаружен по реакции со специфическими антителами с использованием блоттинга [416].

Электроперенос белков на нитроцеллюлозу. После разделения с помощью электрофореза по Леммли [207] перенос белков на нитроцеллюлозную бумагу осуществляется следующим образом. Нитроцеллюлозную бумагу смачивают в электрофоретическом буфере (24 мМ трис+192 мМ глицин+20%-ный мер-

каптоэтанол, рН 8,3) и затем кладут на гель. Образовавшийся «сандвич» гель — нитроцеллюлоза между двумя слоями бумаги ватман 3 ММ (также предварительно смоченной) помещают в электроблот (фирма Е-С Apparatur) так, чтобы гель располагался со стороны катода, а нитроцеллюлозная бумага — со стороны анода. Перенос проводят в течение 4 ч при 5,0 Вт и непрерывной циркуляции буфера.

Окрашивание солями серебра [281, 253].

1. Нитроцеллюлозную бумагу с белком промывают в течение ночи 0,01 М буфером трис-HCl, pH 7,4.
2. Промывают дважды по 5 мин дистиллированной водой.
3. Вымачивают в 100 мл ферро(II)-цианида калия (0,5%, масс./об.) 5 мин при встряхивании.
4. Ополаскивают дистиллированной водой.
5. Переносят в 100 мл раствора, содержащего 0,2 г нитрата серебра, 0,2 г нитрата аммония и 0,5 мл 37%-ного формальдегида. Встряхивают бумагу в этом растворе 20 мин.
6. Раствор нитратов сливают. Промывают бумагу дважды дистиллированной водой (10 с) и затем еще раз 3 мин свежеперегнанной водой.
7. Оставляют на ночь в 100 мл водного раствора, содержащего 3 г карбоната натрия и 0,25 мл 37%-ного формальдегида.
8. Промывают дважды (в сумме 15 мин) дистиллированной водой.
9. Помещают на 15 мин в 100 мл раствора, содержащего 1,4 мл концентрированного аммиака, 0,07 г NaOH и 0,2 г нитрата серебра.
10. Дважды ополаскивают дистиллированной водой.
11. Помещают в 100 мл раствора, содержащего 5,0 мг лимонной кислоты и 0,019% формальдегида. Белки проявляются в виде светлых полос на желто-коричневом фоне. В том случае, если исходный гель не содержал ДСН, полосы окрашиваются в желто-коричневый цвет и трудно отличимы от фона.

Обнаружение с помощью специфических антител.

Буфер *А*. 10 мМ трис — HCl (рН 7,5), содержащий 0,05 М NaCl, 2 мМ ЭДТА, 4% БСА (фракция V) и 0,1% азида натрия.

Буфер *Б*. 10 мМ трис — HCl (рН 7,5), содержащий 0,05 М NaCl и 2 мМ ЭДТА.

1. Уравновешивают в течение ночи окрашенную комплексом серебра нитроцеллюлозную полоску в 0,01 М трис — HCl (рН 7,4).
2. Переносят в буфер *А* и оставляют на 24 ч при встряхивании.
3. Оставляют на 16 ч при встряхивании в свежем буфере *А*, содержащем соответствующее количество антител.
4. Промывают буфером *Б* (5 раз по 10 мин).
5. Выдерживают в свежем буфере *А*, содержащем ^{125}I-меченный белок А (фирма Sigma) ($2 \cdot 10^5$ имп./мин), в течение 3—4 ч.
6. Промывают буфером *Б* (6 раз по 10 мин).
7. Высушивают на воздухе.
8. Экспонируют с пленкой Kodak (X-Omat AR) с помощью усиливающего экрана при —70 °С.

8.21. Определение белка, присоединенного к твердому носителю

В аффинной хроматографии и твердофазном секвенировании часто бывает необходимо определить количество белка, связанного с инертной матрицей, такой, как агароза, декстраны и целлюлоза. В принципе это может быть сделано гидролизом образца с последующим определением общего азота, но в матрицу может быть включен небелковый азот, например когда исполь-

зуется активация с помощью BrCN или вводится N-содержащая «вставка». Количественный аминокислотный анализ образца белок — матрица часто бывает неудовлетворительным из-за наложения фона высокой концентрации отщепленных углеводов. В альтернативном варианте проводят дифференциальный количественный анализ белка, добавленного к матрице и оставшегося (после интенсивных промывок), не связавшегося белка. Однако существуют методы, позволяющие быстро проводить прямое количественное определение иммобилизованного белка. Они описываются ниже (см. также разд. 12.3.3).

8.21.1. Белок, связанный с матрицей

Современная модификация метода [240, 398]. К связанному с носителем белку добавляется известное количество Cu^{2+}. Количество ионов меди, образовавших комплекс с белком, адекватно количеству иммобилизованного белка. Определяется оно измерением свободных ионов меди по реакции с диэтилдитиокарбаматом.

Реагенты.

А. 0,167 М NaOH, содержащий 3,4 г/л тетрагидрата KNa-тартрата.

Б. К 590 мл реагента *А* добавляют 10 мл 0,2 М $CuSO_4$.

В. Диэтилдитиокарбамат натрия (0,1 г) растворяют в 100 мл 0,025%-ного раствора кристаллического БСА.

Г. Суспензия в деионизованной воде смолы AGI-X8 (фирмы Bio-Rad; 200—400 меш, в хлоридной форме) (200 мг/мл).

Методика. Смолу с иммобилизованным белком тщательно промывают для удаления солей и свободного белка. Пробу смолы центрифугируют 3 мин при 300 *g* и измеряют объем осадка. Добавляют деионизованную воду в соотношении 1 : 1 до 1 : 4 в зависимости от количества связанного белка до получения тестообразной массы. Берут часть этой массы (0,01—0,10 мл) и переносят в пробирку. Разбавляют дистиллированной водой до 1,5 мл. Добавляют 1 мл смеси реагентов (3—6 мл реагента *Б*, разбавленного до 10 мл реагентом *А*). Перемешивают. После 15 мин стояния при комнатной температуре приливают 5 мл реагента *В*. Перемешивают и центрифугируют при низкой скорости. Измеряют поглощение при 446 или 486 нм окрашенной в темно-желтый цвет жидкости над осадком против кюветы с водой. С образцом необработанной смолы проводят контрольные измерения.

Градуировочный график. К 0,5 мл серии растворов, содержащих 50—800 мкг белка-стандарта, добавляют 1 мл реагента *Б*. Смешивают и через 15 мин добавляют 1 мл смолы и 5 мл реагента *В*. Центрифугируют и измеряют поглощение, как описано выше.

8.21.2. Белок, связанный с сефарозой [127]

Реагент. Растворяют 50 г полиэтиленгликоля (*М* 20 000) в 50 мл воды.

Методика. Помещают суспензию сефароза — связанный белок (0,2 мл — 1 мл) в кварцевую кювету (с длиной пути луча 1 см). Добавляют раствор полиэтиленгликоля шприцем до конечного объема 3 мл. Перемешивают аккуратно, чтобы не образовались пузырьки воздуха. Измеряют поглощение при 280 нм против образца смолы без белка.

Строят линейный график зависимости поглощения от концентрации белка. Чувствительность 20 мкг белка/0,5 мл сефарозы. Градуировочный график

может быть построен по данным, полученным путем добавления увеличивающихся количеств белка к суспензии геля (использовалась апоглицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа).

8.21.3. Определение аминогрупп на твердом носителе [214]

8.21.3.1. Пикратный метод.

Реагенты.

Пикриновая кислота 0,1 *M* в метиленхлориде.

N,N-диизопропилэтиленамин, перегнанный над CaH_2.

Методика. Обрабатывают смолу (~50 мг) на стеклянной воронке (внутренний диаметр 1 см) дважды 2 мл раствора пикриновой кислоты, а затем промывают 40 мл чистого метиленхлорида. Добавляют N,N-диизопропилэтиленамин (2 мл), затем метанол (2 мл) и вновь амин (2 мл), удаляя жидкость каждый раз путем отсасывания. Фракции промывок объединяют и разбавляют 95%-ным этанолом до 250 мл. Измеряют поглощение при 358 нм. Для комплекса амин — пикрат $\varepsilon = 14500$.

8.21.3.2. Метод титрования.

Реагенты.

1 *M* HCl.

10%-ный триэтиламин в диметилформамиде (ДМФ).

Раствор нитрата ртути, оттитрованный по KCl.

Бромофеноловый синий, 1%-ный раствор (масс./об.) в этаноле.

Дифенилкарбазон, 1%-ный (масс./об.) раствор в этаноле.

Методика. Промывают смолу (~50 мг) 20 мл 1 *M* HCl, затем 40 мл деионизованной воды и 5 мл метанола.

Последовательно промывают 4 мл 10%-ного триэтиламина в ДМФ, 2 мл ДМФ и 4 мл метанола. Разбавляют объединенные промывки 20 мл воды и 80 мл этанола. Добавляют 5 капель бромофенолового синего и подкисляют смесь до образования желтой окраски осторожным прибавлением разбавленной (0,5 *M*) азотной кислоты. Добавляют 5 капель 1%-ного дифенилкарбазона (индикатор) и титруют стандартным раствором нитрата ртути до появления розового окрашивания, свидетельствующего об избытке ионов ртути.

Замечание. Согласно работе [214], эти две методики оказались наиболее удобными (исследовались 4 методики) для определения аминогрупп на стеклянных шариках с определенным размером пор.

Определение аминогрупп с использованием реакции образования основания Шиффа с салициловым альдегидом с последующим измерением поглощения при 315 нм [62] дает лучшие результаты, чем с помощью 2-гидрокси-1-нафтальдегида [331].

8.21.4. Определение аминогрупп на гидрофильных матрицах

Этот модифицированный вариант [4] метода [257] предназначен для гидрофильных матриц, поскольку реакция идет только в водной среде.

Определенный объем геля, содержащий не более 4—5 мкмоль аминогруппы разбавляют водой до 9 мл 0,1 *M* $K_2B_4O_7$ и добавляют 1 мл 0,01 *M* тринитробензойной кислоты. Одновременно готовят раствор для сравнения из тех же объемов реагентов, но без геля. Позволяют гелю осесть или центрифугируют. 1 мл супернатанта разбавляют 5 мл 0,1 *M* $K_2B_4O_7$ и добавляют 0,5 мл 0,03 *M* глицина. В «глухом» опыте вместо раствора глицина добавля-

ют 0,5 мл воды. После 25 мин стояния при 25 °C приливают 10 мл холодного метанола и измеряют поглощение при 340 нм.

Концентрацию аминогрупп на геле определяют по разности поглощения исследуемого образца и контрольного раствора (ε=12400). Ошибка определения <10%.

8.21.5. Определение аминогрупп реакцией с хлоранилом [64, 65]

Это быстрый метод обнаружения свободных аминов и первичных или вторичных аминогрупп на смоле может быть использован для контроля полноты протекания реакции конденсации в твердофазном синтезе пептидов или при блокировании аминогрупп.

Реагенты.

Насыщенный раствор хлоранила (2,3,5,6-тетрахлоро-1,4-бензохинон) в толуоле.

Методика.

1. Помещают в небольшую пробирку 1 мг смолы с пептидом.
2. Для обнаружения первичных аминогрупп добавляют 200 мкл ацетальдегида, для вторичных — 200 мкл ацетона.
3. Приливают 50 мкл раствора хлоранила и размешивают 5 мин при комнатной температуре.

В присутствии свободных аминогрупп на поверхности смолы образуется зеленая или голубая окраска. Чувствительность 5 мкмоль/г смолы, т. е. приблизительно такая же, как у нингидриновой реакции.

8.21.6. Определение природы заместителя на смоле по окрашиванию [84]

Приливают 1 мл насыщенного раствора бората натрия к набухшим в воде (0,2—0,5 мл) агарозе или полиакриламиду. Добавляют 3 капли 3%-ного (масс./об.) водного раствора 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты и оставляют на 2 ч при комнатной температуре для завершения реакции. Незамещенные полимеры и смолы, содержащие карбоксильные и бромоацетильные группы, дают желтое окрашивание; производные, содержащие первичные алифатические амины, — оранжевое, ароматические амины — красно-оранжевое, гидразиды — темно-красное.

8.21.7. Колориметрическое определение карбодиимидов [181]

Реагенты.

2 M солянокислый пиридин и 1 M солянокислый 1,2-диаминоэтан (pH 7,0) для водорастворимых карбодиимидов (измерение при 400 нм).

2 M солянокислый пиридин и 1 M солянокислый пиперазин (pH 7,0) для водонерастворимых карбодиимидов (измерение при 420 нм).

Методика. Добавляют 0,1 мл водорастворимого карбодиимида к 1 мл раствора реагента. Через 20 мин измеряют поглощение при 400 нм. Водонерастворимый карбодиимид анализируют в диметилформиде с измерением поглощения при 420 нм.

Замечание. Реакция специфична для карбодиимидов, побочных продуктов при конденсации не образуется. Поглощение увеличивается линейно (в зависимости от концентрации карбодиимида) в течение 6 ч, в этих же ус-

ловиях строится градуировочный график. Диапазон определяемых концентраций 50 мкмоль/л — 50 ммоль/л, при меньших количествах для увеличения интенсивности окраски инкубируют смесь при 45 °С.

8.21.8. Флуорометрическое определение карбодиимида [60]

В пробирке со стеклянной пробкой смешивают 100 мкл исследуемого раствора и 100 мкл 20 мМ раствора *транс*-аконитовой кислоты в безводном диоксане (высушенном и перегнанном над металлическим натрием). Нагревают 10 мин при 50 °С. Затем прибавляют 50 мкл 0,2 М пиридина в безводном диоксане и разбавляют 2,5 мл метанола. Измеряют флуоресценцию сразу же при длине волны возбуждающего света 400 нм и эмиссионного света — 490 нм против контрольного раствора. Зависимость интенсивности флуоресценции от количества карбодиимида линейна вплоть до 50 нмоль.

транс-Аконитовая кислота может быть использована при обнаружении карбодиимидов в качестве опрыскивающего реагента пластин в методе тонкослойной хроматографии.

8.22. Углеводсодержащие белки

8.22.1. Введение

В сотрудничестве с Дж. Клампом (J. Clamp)

Гликопротеины относятся к биополимерным молекулам, широко распространенным в живых организмах. Они могут быть внутри- и внеклеточными, присутствовать в качестве мембранных компонентов или в растворе, существовать в форме фибриллярных структур или типичных глобулярных белков. Более половины всех изученных детально белков содержат ковалентно присоединенные сахара, поэтому при исследовании нового белка всегда нужно иметь в виду, что это может быть гликопротеин.

Влияние присутствия углеводных компонентов на свойства белковой молекулы зависит от их содержания, которое варьирует в широких пределах от $\leqslant 1\%$ до $\geqslant 80\%$. Присоединение к пептидной цепи среднего размера одной или двух небольших олигосахаридных цепей, почти никак не сказывается на типично «белковых» свойствах соединений. В то же время гликопротеины с высоким содержанием сахаров фактически ведут себя как полисахариды. Большинство гликопротеинов, однако, характеризуется содержанием углеводов, средним между этими двумя экстремальными случаями. Любой белок может быть «заподозрен» в своей принадлежности к гликопротеинам, особенно в случае аномального поведения при гель-фильтрации, ультрацентрифугировании, окрашивании, измерении ультрафиолетового поглощения и т. д.

Простейший способ подтверждения возникающего предположения, применяемый многими исследователями в этой обла-

сти,— поиск в образце с помощью аминокислотного анализа гексозаминов, наиболее распространенные из которых глюкозамин и галактозамин. Для большинства аминокислотных анализаторов прилагаемые руководства включают данные о поведении этих двух гексозаминов в применяемой системе, если же эти данные не приводятся, то нетрудно сделать это экспериментальным путем. Следует иметь в виду, однако, что не все гликопротеины содержат гексозамин и значительное количество углеводов разрушается в жестких условиях гидролиза, используемого при аминокислотном анализе.

Наиболее часто типичные гликопротеины млекопитающих содержат следующие моносахариды: L-фукозу (6-дезокси-L-галактоза), D-маннозу, D-галактозу, N-ацетил-D-глюкозамин (2-ацетамид-2-дезокси-D-глюкоза) и сиаловые кислоты (различные производные нейраминовой кислоты). В состав некоторых гликопротеинов входят D-глюкоза или N-ацетил-D-галактозамин (2-ацетамид-2-дезокси-D-галактоза). Наилучшие результаты для разделения, идентификации и количественного определения этих семи моносахаридов достигаются с помощью газожидкостной хроматографии. Существует два основных метода модификации сахаров для последующего анализа газожидкостной хроматографией: альдит-ацетатный и метилгликозид-триметилсилильный. Первый включает водный кислый гидролиз с последующим восстановлением образующихся альдоз до соответствующих альдитов и их ацетилирование; второй основан на применении метанолиза, приводящего к образованию метилгликозидов и метиловых эфиров сиаловых кислот, которые затем превращаются в триметилсилильные производные.

Следует иметь в виду, что белки, для которых в качестве стадии очистки использовались колонки с сефадексом, могут содержать глюкозу в качестве примеси.

8.22.2. Метилгликозид-триметилсилильный метод

В сотрудничестве с Дж. Кламном (Z. Clamp)

Метод разработан в лаборатории автора и подробно описывается ниже.

Метанолиз. Используют 1,0 M HCl в сухом метаноле, приготовленном перегонкой над реактивом Гриньяра. Сухой газообразный HCl из баллона (BDH Ltd.) пропускают в 250 мл метанола, находящегося в ледяной бане. При умеренной скорости подачи газа за 15 мин достигается концентрация HCl>1,0 моль/л, поэтому раствор затем разбавляется сухим метанолом до концентрации 1 моль/л. Молярность обычно определяется титрованием аликвоты раствора гидроксидом натрия. Затем раствор HCl в метаноле разливают в 10-мл ампулы, которые продувают азотом, запаивают и хранят при —20 °С.

Количество гликопротеина, необходимое для анализа, определяется содержанием в нем углеводов и в оптимальном варианте составляет 25—125 нмоль каждого моносахарида. При исследовании нового белка обычно

берутся пробы по 1—2 мг, что при обычном (среднем) содержании углеводов дает достоверные результаты. Пробу белка (гликопротеина) с введенными внутренними стандартами — маннитом (100 нмоль) и персеитом (100 нмоль) — помещают в ампулу на 2 мл и высушивают. К сухому остатку приливают 0,5 мл HCl в метаноле, продувают азотом, запаивают и нагревают 24 ч при 85 °С.

По окончании метанолиза смесь нейтрализуют карбонатом серебра, тонкорастертый порошок которого добавляют небольшими порциями, контролируя pH среды с помощью индикаторной бумаги с узкими интервалами значений pH.

N-Ацетилирование. В процессе метанолиза происходит частичное деацетилирование N-ацетилгексозаминов. Для бокирования освободившихся групп требуется дополнительное ацетилирование, которое осуществляется добавлением 0,1 мл уксусного ангидрида к нейтрализованной реакционной смеси, что одновременно препятствует адсорбции сахаров на частицах хлорид-карбоната серебра. Смесь оставляют стоять 6 ч и затем центрифугируют. Супернатант переносят в 5 мл грушевидную колбу. К остатку в ампуле добавляют 0,5 мл метанола, перемешивают, центрифугируют и надосадочную жидкость также переносят в ампулу. Процедуру повторяют дважды и объединенные растворы упаривают при 35 °С. Очень важно при этом тщательно удалить следы уксусного ангидрида, поэтому при сохранении характерного запаха к остатку еще раз приливают метанол и вновь высушивают. После добавления третьего внутреннего стандарта — арабита (50 нмоль в метаноле) — вновь упаривают смесь при нагревании. В реакционной колбе таким образом находятся метиловые эфиры метилгликозидов моносахаридов, внутренние стандарты — арабит, маннит и персеит в смеси с некоторыми аминокислотами и пептидами, образовавшимися в результате разрушения полипептидной цепи и не мешающими дальнейшему анализу. На этой стадии высушенный образец может храниться в вакуумном эксикаторе над пентаоксидом фосфора до анализа.

Триметилсилилирование. Свободные гидроксильные группы сахаров должны быть защищены перед проведением газовой хроматографии и триметилсилилирование является для этого идеальной процедурой. Реакция протекает быстро и количественно, при комнатной температуре, а введение большого числа метильных групп приводит к повышению чувствительности определения с помощью пламенно-ионизационного детектора. В качестве реагента используют смесь триметилхлоросилан — гексаметилдисилазан — пиридин (1 : 1 : 5). Готовят ее еженедельно и хранят в плотно закрытом сосуде. При стоянии возможно образование небольшого количества хлорида аммония, который удаляют центрифугированием перед использованием реагента. К сухому образцу прибавляют 0,05 мл смеси реагентов и оставляют на 30 мин при комнатной температуре без доступа влаги (можно использовать «сухую» камеру). Затем реакционную смесь центрифугируют и 1—5 мкл супернатанта вводят в газовый хроматограф.

Газожидкостная хроматография. Из практического опыта следует, что большинство проблем, встречающихся при использовании метода газовой хроматографии, связано с несоблюдением требований к набивке колонки. Здесь важно соблюдать каждое, даже пусть мелкое указание. Используют стеклянные колонки размером 2 м×2—3 мм (внутренний диаметр). Упаковка — высококачественный диатомит, промытый кислотой и силанизированный, покрытый 3—4% фазы SE-30. Соответствующие материалы поставляют ряд фирм. После инжекции включают программу нагревания от 120 до 210 °С со скоростью 1 град/мин.

Для вычисления поправочных коэффициентов по внутренним стандартам через колонку по полной программе пропускают смесь моносахаридов. С нейтральными гексозами обычно не возникает проблем, но полярные сахара — N-ацетилгексозамины и сиаловые кислоты — выступают прямо-таки как чув

ствительные индикаторы эффективности работы колонки. Пики сахаров должны быть строго симметричны, появление небольших или размытых пиков свидетельствует о плохом состоянии колонки.

Для приведения колонки в рабочий режим периодически по нескольку часов через нее пропускают смесь для триметилсилилирования в медленном потоке азота при 120 °С. В зависимости от исходного состояния колонки для этого может потребоваться несколько дней или даже недель, процесс можно ускорить пропусканием через определенные интервалы времени смеси сахаров-стандартов. Подробности метода описаны в работах [25, 52, 67, 68, 70, 71].

8.22.3. Определение уроновых кислот, гексозаминов и галактозы гликозаминогликанов метилгликозид-триметилсилильным методом [98]

Производные углеводов приготовлены по модифицированной методике [70] (см. также предыдущий раздел).

Газожидкостная хроматография. Колонка из плавленного кварца (25 м×0,32 мм) с жидкой фазой CP$\xrightarrow{tm}$Sil5 (фирма Chrompak); пламенно-ионизационный детектор; скорости потоков газа-носителя (N_2) 0,7 мл/мин, газа-ускорителя к детектору 30 мл/мин; температура ввода 22 °С, температура детектора 280 °С; температурная программа от 135 до 215 °С, 1 град/мин. Разделение всех пертриметилсилильных производных метилгликозидов, включая арабит, маннит, маннозу, глюкозу (2 пика) и галактозу (4 пика), достигается менее чем за 60 мин. Выходы производных моносахаридов для всех изученных гликозаминогликанов >87% (в расчете на гексозамин).

8.22.4. Чувствительный метилгликозид-триметилсилильный метод [53]

Образец гликопротеина (0,5—10 мкг) или стандарта-углевода (0,1—1 нмоль) высушивают над P_5O_5 в вакууме в сосуде объемом 100 мкл типа Reactivial. В качестве внутреннего стандарта может быть использован *мезо*-инозит. Добавляют сухой раствор HCl в метаноле (40 мкл, 0,625 моль/л) и метилацетат (10 мкл). Закрывают сосуд пробкой с тефлоновой прокладкой, перемешивают на вибраторе и выдерживают 16 ч при 70 °С. Охлаждают. Добавляют *трет*-бутиловый спирт (10 мкл) и высушивают в потоке азота, не содержащего следов кислорода.

N-Ацетилирование. К остатку при перемешивании последовательно добавляют метанол (50 мкл), пиридин (5 мкл), уксусный ангидрид (5 мкл) и оставляют на 15 мин. Тщательно высушивают сначала в потоке азота, а затем в вакууме над P_2O_5. Силилируют добавлением 20 мкл силилирующего агента ((Sylon HTP, фирма Supelco). Перемешивают на вибромешалке и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. Высушивают. Остаток немедленно растворяют в 14 мкл гексана и наносят все количество образца на колонку газожидкостного хроматографа.

Газожидкостная хроматография. Капиллярная колонка из плавленного кварца WCOT (25 м×0,32 мм) с жидкой фазой CP-Sil 5 (фирма Chrompak); температурная программа: нагревание 140 °С в течение 12 мин, затем повышение температуры со скоростью 8 град/мин до 260 °С; пламенно-ионизационный детектор.

Разделение 29 ТМС-производных простых сахаров, аминосахаров и уроновых кислот достигнуто менее чем за 16 мин. Чувствительность <100 пмоль для каждого пика.

8.22.5. Метод газовой хроматографии — масс-спектрометрии [224]

Интактные гликопротеины метилируют, гидролизуют, восстанавливают и ацетилируют. После разделения колоночной хроматографией полученные производные сахаров анализируют методом масс-спектрометрии. См. обзор [250] по применению ГХ, ВЭЖХ и масс-спектрометрии в анализе углеводных комплексов.

8.22.6. Определение нейтральных сахаров и аминосахаров в виде альдитацетатов методом ГЖХ [155]

Методика быстрая и простая в экспериментальном отношении. Аминосахара предварительно дезаминируют обработкой азотистой кислотой, в качестве главных продуктов при этом образуются 2,5-ангидроманноза (из глюкозамина), 2,5-ангидроталоза (из галактозамина) и глюкоза (из маннозамина). Альдитацетаты, приготовленные непосредственно из аминосахаров, имеют значительно большие времена удерживания по сравнению с этими же величинами для производных нейтральных сахаров на обычно используемых колонках.

Дезаминирование. К водному раствору образца (0,1 мл), содержащему до 2 мг аминосахара добавляют 100 мг твердого нитрита натрия. Охлаждают смесь во льду и прибавляют 0,1 мл 9 *М* серной кислоты, выдерживают 5 мин и затем оставляют постепенно нагреваться до комнатной температуры. Через 25 мин подщелачивают раствор 0,2 мл 15 *М* водного аммиака, затем восстанавливают и алкилируют по методу, описанному в работе [29].

Восстановление. К 0,1 мл раствора сахара в 1 *М* аммиаке добавляют 1 мл раствора борогидрида натрия (2%, масс./об.) в безводном диметилсульфоксиде. Выдерживают 90 мин при 40 °С, избыток борогидрида разрушают добавлением 0,1 мл ледяной уксусной кислоты.

Ацетилирование. К восстановленному моносахариду добавляют катализатор 1-метилимидазол (0,2 мл) и затем уксусный ангидрид (2 мл). Перемешивают. Оставляют при комнатной температуре на 10 мин и затем приливают 5 мл воды для разрушения избытка уксусного ангидрида. По охлаждении добавляют 1 мл дихлорэтана, перемешивают. После разделения фаз отделяют нижний слой для анализа методом ГЖХ. Вводят 2 мкл на колонку, остаток хранят при —20 °С.

Газожидкостная хроматография. Стеклянная капиллярная колонка SCOT (28,5 м×0,5 мм) с жидкой фазой Silar 10С. Температурная программа: нагревание до 190 °С за 4 мин, а затем до 250 °С со скоростью 4 град/мин.

Пятнадцать альдитацетатов дезаминированных аминосахаров были разделены менее чем за 20 мин. Метод применялся к анализу хитина и гликопротеинов.

8.22.7. Определение альдитов тонкослойной и газожидкостной хроматографией [387]

Восстановленные и перметилированные олигосахариды (1—2 мг, содержащие до 15 остатков моносахаров) были разделены на пластинках с тонким слоем силикагеля 60 TLC (250 мкм, фирма Merck) без предварительной их активации в системе бензол — метанол (16 : 1 или 10 : 1). Нанесение образца в виде полосы и хроматография дважды в камерах, стенки которых изнутри (для полноты насыщения) обложены смоченной растворителями фильтровальной бумагой. Для обнаружения использовали опрыскивание 0,5%-ным

раствором орцина в 2 М серной кислоте. Чувствительность 0,5 мкг сахара.

Определяющими факторами при разделении дисахаридов являются положение гликозидной связи, конфигурация аномера и природа сахара.

Газожидкостная хроматография. Капиллярная колонка из плавленого кварца (12 м×0,25 мм), стенки которой покрыты химически связанной фазой DB-1 (слой 0,1 мкм, J. and W. Scientific); газ-носитель — гелий, линейная скорость 0,37 см/с; температурная программа: нагревание от 150 °С до 330 °С со скоростью 5 град/мин. Чувствительность 30 нг для софорозы (Glc β1-2Glc).

8.22.8. Определение глюкозамина, галактозамина, триптофана и лизиноаланина на аминокислотном анализаторе [184]

Условия гидролиза аминосахаров. Гидролизуют в вакууме 4 М HCl при 100 °С, 5 ч. Высушивают. Растворяют в 3 мл 2%-ного N-этилморфолинацетата (pH 9) и пропускают через колонку (50×9 мм) со смолой дауэкс 2-×4-, уравновешенную 1%-ным N-этилморфолинацетатом (pH 90) для удаления пептидов других продуктов гидролиза, могущих помещать анализу аминосахаров [108].

Собирают первые 20 мл элюата с колонки, добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл 50%-ного глицерина в этаноле [93]; высушивают (глицерин снижает возможные потери за счет адсорбции на поверхности стекла). Растворяют остаток в воде. Высушивают и снова растворяют в воде. Высушивают, для загрузки на колонку растворяют в буфере *Б* (см. ниже), содержащем 0,4% тиодигликоля.

Условия гидролиза триптофана. Проводят щелочной гидролиз (4,8 М NaOH) с 25 мг крахмала в присутствии 10 мкл 5%-ного октанола 1 в толуоле ([168]; см. также разд. 8.7.1.1.) и 5-метилтриптофана в качестве внутреннего стандарта. Используют полипропиленовые пробирки с завинчивающимися крышками (уплотнительные кольца удаляют) (фирма Vanguard International) в качестве вкладышей в стеклянные пробирки (150×18 мм). Пробирки запаивают в вакууме и нагревают 24 ч при 128 °С в термостате. Охлаждают, нейтрализуют добавлением 420 мкл охлажденной во льду 6 М HCl, разбавленной до 5,0 мл буфером *Б*, содержащим 0,1% тиогликолята. Центрифугируют 4 мин при 20 000 *g* для удаления осадка перед нанесением на колонку.

Аминосахара могут быть разделены на коротких колонках со специальным буфером [301] или на длинных колонках при малой скорости потока [108а]. Часто это бывает неудобным, и ниже описаны условия разделения на анализаторе Beckman 119CI с колонкой 6×260 мм, заполненной смолой W-3H и детекцией нингидриновой реакцией со стандартными буферами, используемыми в аминокислотных анализаторах.

Буферы.

А (готовят из раствора с концентрацией, в 10 раз более высокой, pH 3,25). 0,2 М цитрат натрия, содержащий 1% пропанола-2, 0,25% тиодигликоля и октановой кислоты, доведен до pH 3,33 10 М NaOH.

Б (готовят из раствора с концентрацией, в 5 раз более высокой, pH 4,12). 0,2 М цитрат натрия, содержащий 0,2 М хлорид натрия, 0,25% тиодигликоля, подкислен до pH 3,95 концентрированной HCl.

В (готовят из раствора с концентрацией в 5 раз более высокой, pH 6,4). 0,2 М цитрат натрия, содержащий 0,8 М хлорид натрия, 0,05% октановой кислоты, pH 6,4.

Условия хроматографии. Для анализа белковых аминокислот:

0—38 мин, буфер *А*;
38—62 мин, буфер *Б*;

62—115 мин, буфер *В*;
115—120 мин, 0,2 *М* NaOH;
120—140 мин буфер *А* для уравновешивания.
Температурная программа: нагревание от 47 до 65 °C за 28 мин.
Скорость потока буфера 35 мл/ч.
Скорость потока нингидрина 17,5 мл/ч.
Для анализа Trp, 5-Me-Trp, Glc-NH_2 и Gal-NH_2:
0—20 мин, буфер *Б*;
20—75 мин, буфер *В*;
75—80 мин, 0,2 М NaOH;
80—100 мин буфер *Б* для уравновешивания.
Температура в рубашке колонки (70 °C) поддерживается с помощью термостата.

Времена удерживания (приблизительно).
Кислые и нейтральные аминокислоты элюируются в интервале 25 мин. Tyr на 29-й минуте, Phe на 34-й, Glc-NH_2 на 40-й, Gal-NH_2 на 42-й, лизиноаланин на 46-й, His на 48-й, Lys на 52-й, Trp на 59-й, NH_3 на 65-й, Arg на 78-й, 5-Me Trp на 79 й.

8.22.9. Определение нейтральных сахаров и аминосахаров на аминокислотном анализаторе [2, 94]

Нейтральные сахара и аминосахара из гликопротеинов и олигосахаридов разделены на колонке аминокислотного анализатора со смолой ДС 4А (фирма Durrum). Определение сахаров проводилось флуорометрически модификацией элюата ОФА-реагентом. Чувствительность обнаружения 8 пмоль.

8.23. Благодарности

Автор выражает признательность за финансовую поддержку в течение ряда лет United Kingdom Medical Research and Research Counsils, University of London Central Research Fund, G. D. Seartle and C. Ltd., the Wellcome Trust and the Ministry of Defence (The Physiological Laboratory, AMTE).

Литература

1. *Aitken A., Morrice N.*, Methods in Protein Sequence Analysis, Fifth Internat. Conf., Walker J. (Ed.), abst. p 30, Churchill College, Cambridge, 1984.
2. *Allfrey V. G., Di Paolo E. A., Sterner R.*, Methods Enzymol, **107**, 224—240 (1984).
3. *Allington W. B., Cordry A. L., McCullough G. A., Mitchell D. E., Nelson J. W.*, Anal Biochem, **85**, 188—196 (1978).
4. *Antoni G., Presentini R., Neri P.*, Anal. Biochem, **129**, 60—63 (1983).
5. *Aplin J. D., Hughes R. C.*, Anal. Biochem, **113**, 144—148 (1981).
6. *Auffret A. D., Williams D. H., Thatcher D. R.*, FEBS Lett., **90**, 324—326 (1978).
7. *Augustyniak J. Z., Martin W. G.*, Can. J Biochem, **43**, 291—292 (1965).
8. *Balis M. E.*, Methods Biochem. Anal., **20**, 103—133 (1971).
9. *Ballentine R.*, Methods Enzymol, **3**, 984—995 (1957).
10. *Barbarash G. R., Quarles R. H.*, Anal Biochem., **119**, 177—184 (1982).
11. *Barman T. E., Koshland D. E., Jr.*, J Biol. Chem., **242**, 5771—5776 (1967).
12. *Barrett G. C.*, Advances in Chromatogr., **11**, 145—179 (1974)
13. *Barth G., Voelter W., Bunnenberg E., Djerassi C.*, J. Am. Chem. Soc., **94**, 1293—1298 (1972).
14. *Basha S. M. M., Roberts R. M.*, Anal. Biochem., **77**, 378—386 (1977).

15. *Bayer E., Grom E., Kaltenegger B., Uhmann R.*, Anal. Chem., **48**, 1106—1109 (1976).
16. *Bennett H. P. J., Browne C. A., Solomon S.*, J. Liquid Chromatogr., **3**, 1353—1365 (1980).
17. *Bensadoun A., Weinstein D.*, Anal. Biochem., **70**, 241—250 (1976).
18. *Benson J. R.*, U.S. Patent No. 3 686 118, 1972.
19. *Benson J. R.*, In: Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis, Perham R. N. (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 1975, pp. 1—39.
20. *Benson J. R.*, Methods Enzymol., **47**, 19—31 (1977).
21. *Benson J. R., Hare P. E.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**, 619—622 (1975).
22. *Benson J. V., Jr.*, Anal. Biochem., **50**, 477—493 (1972).
23. *Berson G.*, Anal. Biochem, **134**, 230—234 (1983).
24. *Beyer R. E.*, Anal. Biochem., **129**, 483—485 (1983).
25. *Bhatti T., Chambers R., Clamp J. R.*, Biochim. Biophys. Acta, **222**, 339—347 (1970).
26. *Bibring T., Baxandall J.*, Anal. Biochem., **85**, 1—14 (1978).
27. *Blackburn S*, In: Amino Acid Determination, Blackburn S. (Ed), 2nd edn, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978, pp. 7—37.
28. *Blackburn S.*, In: Amino Acid Determination, Blackburn S. (Ed.), 2nd edn. Marcel Dekker, New York, Basel, 1978, pp. 109—187.
29. *Blakeney A. B., Harris P. J., Henry R. J., Stone B. A.*, Carbohydr. Res., **113**, 291—299 (1983).
30. *Blau K.*, In: Biomedical Applications of Gas Chromatography, Szymanski H. A. (Ed.), vol 2, Plenum Press, New York, 1968, pp. 1—52.
31. *Block R. J., Burrum E. L., Zweig G.*, Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2nd edn, Academic Press, New York, 1958.
32. *Blombäck B.*, Methods Enzymol., **11**, 398—413 (1967).
33. *Böhlen P., Mellet M.*, Anal. Biochem, **94**, 313—321 (1979).
34. *Bonting S. L., Jones M.*, Arch. Biochem. Biophys., **66**, 340—353 (1957).
35. *Boulikas T., Hancock R*, J. Biochem. Biophys Methods, **5**, 219—228 (1981).
36. *Bounias M*, Anal Biochem., **106**, 291—295 (1980)
37. *Boyer P. D.*, J. Am. Chem. Soc, **76**, 4331—4337 (1954).
38. *Bradford M. M.*, Anal. Biochem., **72**, 248—254 (1976).
39. *Bradstreet R. B.*, The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen, Academic Press, New York, London, 1965.
40. *Bramhall S., Noack N., Wu M., Loewenberg J. R.*, Anal. Biochem, **31**, 146—148 (1969)
41. *Brauer A. W., Oman C. L., Margolies M. N.*, Anal. Biochem., **137**, 134—142 (1984).
42. *Brautigan D. L., Ferguson-Miller S., Tarr G. E., Margoliash E.*, J. Biol. Chem., **253**, 140—148 (1978).
43. *Brautigan D. L., Bornstein P., Gallis B.*, J. Biol. Chem., **256**, 6519—6522 (1981).
44. *Brenner M., Niederwieser A.*, Methods Enzymol., **11**, 27—31 (1967).
45. *Bricknell K. S., Finegold S. M.*, Anal. Biochem., **51**, 23—31 (1973).
46. *Brogdon W. G., Dickinson C. M.*, Anal. Biochem., **131**, 499—503 (1983).
47. *Brown J. L., Roberts W. K.*, J. Biol. Chem., **251**, 1009—1014 (1976).
48. *Burkhardt W. A., Wilcox P. E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **28**, 803—808 (1967).
49. *Burnette W. N.*, Anal. Biochem., **112**, 195—203 (1981).
50. *Cadman E., Bostwick J. R., Eichberg J.*, Anal. Biochem., **96**, 21—23 (1979).
51. *Capony J.-P., Demaille J. G.*, Anal. Biochem., **128**, 206—212 (1983).
52. *Chambers R. E., Clamp J. R.*, Biochem. J, **125**, 1009—1918 (1971).
53. *Chaplin M. F.*, Anal. Biochem., **123**, 336—341 (1982).
54. *Chauhan J., Darbre A.*, J. Chromatogr., **211**, 347—359 (1981).

55. *Chauhan J., Darbre A.*, J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **4**, 11—16 (1981).
56. *Chauhan J., Darbre A.*, J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 4, 260—265 (1981).
57. *Chauhan J., Darbre A.*, J. Chromatogr., **227**, 305—321 (1982).
58. *Chauhan J., Darbre A.*, J. Chromatogr., **236**, 151—156 (1982).
59. *Chauhan J., Darbre A.*, J. Chromatogr., **240**, 107—115 (1982).
60. *Chen S.-C.*, Anal. Biochem., **132**, 272—275 (1983).
61. *Chiapelli F., Vasil A., Haggerty D. F.*, Anal. Biochem., **94**, 160—165 (1979).
62. *Chou Y.-S., Chien H.-C.*, Sheng Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Wu Li Li Chin Chan, **22**, 12—14 (1978).
63. *Chrambach A., Nguyen N. Y.*, In: Electrokinetic Separation Methods, Righetti P. J., van Oss C. I., Varderhoff J. W. (Ed.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1978, pp. 337—367.
64 *Christensen T.*, Acta Chem. Scand., **B33**, 763—766 (1979).
65. *Christensen T.*, Pept. Struct. Biol. Funct., Proc. Sixth Am. Pept. Symp., Gross E., Meienhofer J. (Ed.), Pierce, Reckford, Illinois, 1979, pp. 385—388.
66. *Chromy V., Fischer J., Kulhanek V.*, Clin. Chem., **20**, 1362—1363 (1974).
67. *Clamp J. R.*, Biochem. Soc. Trans., **2**, 64—66 (1974).
68. *Clamp J. R.*, Biochem. Soc. Symp., **40**, 3—16 (1974).
69. *Clamp J. R., Hough L.*, Biochem. J., **94**, 17—24 (1965).
70. *Clamp J. R., Bhatti T., Chambers R. E.*, Methods Biochem. Anal., **19**, 229—344 (1971).
71. *Clamp J. R., Bhatti T., Chambers R. E.*, In: Glycoproteins, Gottschalk A. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1972, pp. 612—652.
72. *Clark A. J.*, Laboratory Practice, **28**, 1076—1078 (1979).
73. *Cliffe A. J., Berridge N. J., Westgarth D. R.*, J. Chromatogr., **78**, 333—341 (1973).
74. *Cloete C.*, J. Liquid Chromatogr., 7, 1979—1990 (1984).
75. *Coakley W. T., James C. J.*, Anal. Biochem., **85**, 90—97 (1978).
76. *Cohen S. A., Tarvin T. L., Bidlingmeyer B. L., Tarr G. E.*, Methods in Protein Sequence Analysis, Fifth Internat. Conf., Walker J. (Ed.), abst p. 31, Churchill College Cambridge, 1984.
77. *Congote L. F.*, J. Chromatogr., **253**, 276—282 (1982).
78. *Cooper J. D. H., Turnell D. C.*, J. Chromatogr., **227**, 158—161 (1982).
79. *Cooper J. D. H., Lewis M. T., Turnell D. C.*, J. Chromatogr., **285**, 490—494 (1984).
80. *Copper J. D. H., Ogden G., McIntosh J., Turnell D. C.*, Anal. Biochem., **142**, 98—102 (1984).
81. *Croft L. R.*, Handbook of Protein Sequence Analysis, 2nd edn, Wiley, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1980.
82. *Cromwell L. D., Stark G. R.*, Biochemistry, **8**, 4735—4740 (1969).
83. *Cronin J. R., Hare P. E.*, Anal. Biochem., **81**, 151—156 (1977).
84. *Cronin J. R., Pizzarello S., Gandy W. E.*, Anal. Biochem., **93**, 174 (1979).
85. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., **245**, 3059—3065 (1970).
86. *Cunico R. L., Schlabach T.*, J Chromatogr., **266**, 461—470 (1983).
87. *Dale T., Court W. E.*, Chromatographia, **14**, 617—620 (1981).
88. *Damodaran S.*, Anal. Biochem., **145**, 200—204 (1985).
89. *Darbre A.*, Laboratory Practice, **9**, 726 (1971).
90. *Darbre A.*, In: Amino Acid Analysis by Gas Chromatography, Zumwalt R. E., Kuo R. C. T., Gehrke C. W. (Ed.), CRC Press, Cleveland, Ohio, 1986.
91. *Darbre A., Islam A.*, Biochem. J., **106**, 923—925 (1968).
92. *Davies D., Holdsworth E. S.*, Anal. Biochem., **100**, 92—94 (1979).
93. *Dawson R., Mopper K.*, Anal. Biochem., **84**, 186—190 (1978).
94. *Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M.*, Data for Bioche-

mical Research, 2nd edn, Oxford University Press, London, 1969, pp. 509—557.
95. *De La Llosa P., Abed A. E., Roy M.*, Canad. J. Biochem., **58**, 745—748 (1980).
96. *Desgres J., Boisson D., Padieu P.*, J. Chromatogr., **162**, 133—152 (1979).
97. *De Traglia M. C., Brand J. S., Tometsko A. M.*, Anal. Biochem., **99**, 464—473 (1979).
98. *Dierckxsens G. C., De Meyer L., Tonino G. J.*, Anal. Biochem., **130**, 120—127 (1983).
99. *Dion A. S., Pomenti A. A.*, Anal. Biochem., **129**, 490—496 (1983).
100. *Duggan E. L.*, Methods Enzymol., **3**, 501—504 (1957).
101. *Durham J. P., Lopez-Solis R. O.*, Anal. Biochem., **100**, 98—99 (1979).
102. *Easley C. W.*, Biochem. Biophys. Acta, **107**, 386—388 (1965).
103. *Edelhoch H.*, Biochemistry, **6**, 1948—1954 (1967).
104. *Edman P., Begg G.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80—91 (1967)
105. *Ellman G. L.*, Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70—77 (1959).
106. *Eveleigh J. W., Winter G. D.*, in: Protein Sequence Determination Needleman S. B. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970, pp. 92—95.
107. *Fahmy A. R., Niederwieser A., Pataki G., Brenner M.*, Helv. Chim. Acta, **44**, 2022—2026 (1961).
108. *Fanger M. W., Smyth D. G.*, Anal. Biochem., **34**, 494—499 (1970).
108a. *Fauconnet M., Rochemont J. A.*, Anal Biochem., **91**, 403—409 (1978).
109. *Felker P., Bandurski R. S.*, Anal. Biochem., **67**, 245—262 (1975).
110. *Fields R.*, Methods Enzymol., **25**, 464—468 (1972).
111. *Fleury M. O., Ashley D. V.*, Anal. Biochem., **133**, 330—335 (1983).
112. *Floyd N. F., Cammaroti M. S., Lavine T. F.*, Arch. Biochem. Biophys., **102**, 343—345 (1963).
113. *Flynn G. H., Whitmore T. N.*, Anal Biochem., **131**, 42—45 (1983)
114. *Fransson B., Ragnarsson U., Zetterquist O.*, J. Chromatogr., **240**, 165—171 (1982).
115. *Friedman R. D.*, Anal. Biochem., **126**, 346—349 (1982)
116. *Friedman M., Noma A. T., Wagner J. R.*, Anal. Biochem., **98**, 293—304 (1979).
117. *Gamerith G.*, J. Chromatogr., **256**, 267—281 (1983).
118. *Gamerith G.*, J. Chromatogr., **256**, 326—330 (1983).
119. *Gehrke C. W., Leimer K.*, J. Chromatogr., **57**, 219—238 (1971).
120. *Gehrke C. W., Lamkin W. M., Stalling D. L., Shahroki F.*, Biochem. Biophys Res. Commun., **19**, 328—334 (1965).
121. *Gehrke C. W., Nakomoto H., Zumwalt R. W.*, J. Chromatogr., **45**, 24—51 (1969).
122. *Gehrke C. W., Kuo K., Zumwalt R. W.*, J. Chromatogr., **57**, 209—217 (1971).
123. *Gehrke C. W., Younker D. R., Gerhardt K. O., Kuo K. C.*, J. Chromatogr. Sci., **17**, 301—307 (1979).
124. *Gersten D. M., Zapoldki E. J., Ledley R. S.*, Anal. Biochem., **129**, 57—59 (1983).
125. *Gibson W.*, Anal. Biochem., **132**, 171—173 (1983).
126. *Giulian G. G., Moss R. L., Greaser M.*, Anal Biochem., **129**, 277—287 (1983).
127. *Golovina T. O., Cherednikova T. V., Mevkh A. T., Nagradova N. K.*, Anal. Biochem., **83**, 778—781 (1977).
128. *Goodwin T. W., Morton R. A.*, Biochem J., **40**, 628—632 (1946).
129. *Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M.*, J. Biol. Chem., **177**, 751—766 (1949).
130. *Goshev I., Nedkov P.*, Anal. Biochem., **95**, 340—343 (1979).
131. *Gracy R. W.*, Methods Enzymol., **47**, 195—243 (1977).
132. *Grego B., Hearn M. T. W.*, J. Chromatogr., **255**, 67—77 (1983).

133. *Groves W. E., Davis F. C., Jr., Sells B. H.*, Anal. Biochem., **22**, 195—210 (1968).
134. *Gundberg C. M., Lian J. B., Gallop P. M.*, Anal. Biochem., **98**, 219—225 (1979).
135. *Guynn R. W., Veech R. L.*, Methods Enzymol., **35**, 302—307 (1975).
136. *Habeeb A. F. S. A.*, Anal. Biochem., **14**, 328—336 (1966).
137. *Hager D. A., Burgess R. R.*, Anal. Biochem., **109**, 76—86 (1980).
138. *Hamilton P. B.*, Adv. Chromatogr., **2**, 3—62 (1966).
139. *Hamilton P. B.*, Methods Enzymol., **11**, 15—27 (1967).
140. *Hancock K., Tsang V. C. W.*, Anal. Biochem., **133**, 157—162 (1983).
141. *Hare P. E.*, Space Life Science, **3**, 354—359 (1972).
142. *Hare P. E.*, Methods Enzymol., **47**, 3—18 (1977).
143. *Haroon Y.*, Anal. Biochem., **140**, 343—348 (1984).
144. *Hartree E. F.*, Anal. Biochem., **48**, 422—427 (1972).
145. *Hauschka P. V.*, Anal. Biochem., **80**, 212—223 (1977).
146. *Hauschka P. V., Henson E. B., Gallop P. M.*, Anal. Biochem., **108**, 57—63 (1980).
147. *Haworth C., Heathcote J. G.*, J. Chromatogr., **41**, 380—385 (1969).
148. *Heathcote J. G., Wachington R. J.*, Analyst, **92**, 627—633 (1967).
149. *Heathcote J. G., Wachington R. J., Haworth C., Bell S.*, J. Chromatogr., **51**, 267—275 (1970).
150. *Hediger H., Stevens R. L., Brandenberg H., Schmid K.*, Biochem. J., **133**, 551—561 (1973).
151. *Heinrikson R. L., Meredith S. C.*, Anal. Biochem., **136**, 65—74 (1984).
152. *Hellerman L.*, Physiol. Rev., **17**, 454—484 (1937).
153. *Henderson L. E., Oroszlan S., Konigsberg W.*, Anal. Biochem., **93**, 153—157 (1979).
154. *Henkel H. G.*, J. Chromatogr., **58**, 201—207 (1971).
155. *Henry R. J., Blakeney A. B., Harris P. J., Stone B. A.*, J. Chromatogr., **256**, 419—427 (1983).
156. *Hess H. H., Lees M. B., Derr J. E.*, Anal. Biochem., **85**, 295—300 (1978).
157. *Higuchi M., Yoshida F.*, Anal. Biochem., **77**, 542—547 (1977).
158. *Higuchi M., Yoshida F.*, Agr. Biol. Chem., **42**, 1669—1674 (1978).
159. *Higuchi M., Yoshida F.*, Anal. Biochem., **105**, 90—96 (1980)
160. *Hill D. W., Walters F. H., Wilson T. D., Stuart J. D.*, Anal. Chem., **51**, 1338—1341 (1979).
161. *Hill D., Burnworth L., Skea W., Pfeifer R.*, J. Liquid Chromatogr., **5**, 2369—2393 (1982).
162. *Hirs C. H. W.*, Methods Enzymol., **11**, 59—62 (1967).
163. *Hodgin J. C.*, J. Liquid Chromatogr., **2**, 1047—1059 (1979).
164. *Hoenders H. J., Bloemendal H.*, Biochim., Biophys. Acta, **147**, 183—185 (1967).
165. *Hoffman P. G., Zinder O., Bonner W. M., Pollard H. B.*, Arch. Biochem Biophys., **176**, 375—388 (1976).
166. *Honda K., Sekino J., Imal K.*, Anal. Chem., **55**, 940—943 (1983).
167. *Hsu K.-T., Currie B. L.*, J. Chromatogr., **166**, 555—561 (1978).
168. *Hugli T. E., Moore S.*, J. Biol. Chem., **247**, 2828—2834 (1972).
169. *Hunter T., Sefton B. M.*, Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A., **77**, 1311—1315 (1980).
170. *Hušek P., Macek K.*, J. Chromatogr., **113**, 139—230 (1975).
171. *Ida S., Kuriyama K.*, Anal. Biochem., **130**, 95—101 (1983).
172. *Inglis A. S.*, Methods Enzymol., **91**, 26—36 (1983).
173. *Inglis A. S., Roxburgh C. M., Takayangi H.*, Anal Biochem., **61**, 25—31 (1974).
174. *Inoue S., Tokuyama T., Takai K.*, Anal. Biochem., **132**, 468—480 (1983).
175. *Irie S.*, Seigaku, **52**, 411—413 (1980).
176. *Irie S., Sezaki M., Kato Y.*, Anal Biochem., **126**, 350—354 (1982).

177. *Irreverre F.*, Biochim. Biophys Acta, **111**, 551—552 (1965).
178. *Ishida Y., Fujita T., Asai K.*, J. Chromatogr., **204**, 143—148 (1981).
179. *Ishikawa Y., Wuthier R. E.*, Anal. Biochem., **114**, 388—395 (1981).
180. *Itzhaki R. F., Gill D. M.*, Anal. Biochem., **9**, 401—410 (1964).
181. *Jacobson B. S., Fairman K. R.*, Anal. Biochem., **106**, 114—117 (1980).
182. *James L. B.*, J. Chromatogr., **175**, 211—215 (1979).
183. *Johansen P. G., Marshall R. D., Neuberger A.*, Biochem. J., **77**, 239—247 (1960).
184. *Johnson D. A.*, Anal. Biochem., **130**, 475—480 (1983).
185. *Johnson M. K.*, Anal. Biochem., **86**, 320—323 (1978).
186. *Johnson N. D., Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Anal. Biochem., **100**, 335—338 (1979).
187. *Jones B. N., Gilligan J. P.*, J. Chromatogr., **266**, 471—482 (1983).
188. *Jones B. N., Gilligan J. P.*, Am. Biotechnology Lab., **46**, 47—51 (1983).
189. *Jones B. N., Pääbo S., Stein S.*, J. Liquid Chromatogr., **4**, 565—586 (1981).
190. *Jones K., Heathcote J. G.*, J. Chromatogr., **24**, 106—111 (1966).
191. *Joseph M. H., Davies P.*, J. Chromatogr., **277**, 125—136 (1983).
192. *Junqueira L. C. U., Bignolas G., Brentani R. R.*, Anal. Biochem., **94**, 96—99 (1979).
193. *Kaiser F. E., Gehrke C. W., Zumwalt R. W., Kuo K. C.*, J. Chromatogr , **94**, 113—133 (1974).
194. *Kalb V. F., Jr., Bernlohr R. W.*, Anal. Biochem., **82**, 362—371 (1977).
195 *Kaldy M. S., Kereliuk G. R.*, Laboratory, **27**, 868 (1978).
196. *Kapadia G., Chrambach A.*, Anal Biochem., **48**, 90—102 (1972).
197. *Kerenyi L., Gallyas F.*, Clin. Chim. Acta, **38**, 465—467 (1972).
198. *Kirkman M. A.*, J. Chromatogr., **97**, 175—191 (1974).
199. *Knoop D. R., Morgan E. T., Tarr G. E., Coon M. J.*, J. Biol. Chem., **257**, 8472—8480 (1982).
200. *Koboyashi S., Imai K.*, Anal. Chem , **52**, 424—427 (1980).
201. *Korff R. W.*, von., J. Biol. Chem., **210**, 539—544 (1954).
202. *Koroleva E. M., Maltsev V. G., Belenkii B. G., Viska M.*, J. Chromatogr., **242**, 145—152 (1982).
203. *Kreil G., Kreil-Kriss G.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **27**, 275—280 (1967).
204. *Kuo S. C., Younathan E. S.*, Anal. Biochem., **55**, 1—8 (1973).
205. *Kuwada M., Katayama K*, Anal Biochem., **117**, 259—265 (1981).
206. *Kuwada M., Katayama K.*, Anal. Biochem., **131**, 173—179 (1983).
207. *Laemmli U. K.*, Nature (Lond.), **277**, 680—685 (1970).
208 *Lam S. K.*, J. Chromatogr., **234**, 485—488 (1982).
209. *Lam S., Chow F., Karmen A.*, J. Chromatogr., **199**, 295—303 (1980).
210. *Larsen B. R., West F. G.*, J. Chromatogr., Sci., **19**, 259—265 (1981).
211 *Lasne F., Benzerara O., Lasne Y*, Anal. Biochem., **132**, 338—341 (1983).
212 *Layne E.*, Methods Enzymol., **3**, 447—454 (1957).
213. *Lee K. S., Drescher D. G.*, Int. J Biochem., **9**, 457—467 (1978).
214. *Lee C. C. Y., Loudon G. M.*, Anal. Biochem., **94**, 60—64 (1979).
215. *Lee H.-M., Forde M. D., Lee M. C., Bucher D. J.*, Anal. Biochem., **96**, 298—307 (1979).
216. *Lees M. B., Paxman S.*, Anal. Biochem., **47**, 184—192 (1972).
217. *Leftak I. M.*, Anal. Biochem., **135**, 95—101 (1983).
218. *Lewis R. N. A. H.*, Anal. Biochem., **99**, 136—141 (1979).
219. *Liebezeit G., Dawson R.*, J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun , **4**, 354—356 (1981).
220. *Ligh A., Smith E. L.*, In: The Proteins, Neurath H. (Ed.), vol. 1, 2nd edn, Academic Press, New York, London, 1963, pp. 1—44.
221. *Lindroth P., Mopper K.*, Anal. Chem., **51**, 1667—1674 (1979).
222. *Lischwe M. A., Ochs D.*, Anal. Biochem., **127**, 453—457 (1982).
223. *Liu T.-Y., Chang Y. H.*, J. Biol. Chem., **246**, 2842—2848 (1971).

224. *Lowe M. E., Nilsson B.*, Anal. Biochem., **136**, 187—191 (1984).
225. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.*, J. Biol. Chem., **193**, 265—275 (1951).
226. *Lucas B., Sotelo A.*, Anal. Biochem., **109**, 192—197 (1980).
227. *Ludowieg J., Dorfman A.*, Biochim. Biophys, Acta, **38**, 212—218 (1960).
228. *Lund E., Thomsen J., Brunfeldt K.*, J. Chromatogr., **130**, 51—54 (1977).
229. *MacKenzie S. L.*, Methods Biochem. Anal., **27**, 1—88 (1981).
230. *MacKenzie S. L., Hogge L. R.*, J. Chromatogr., **132**, 485—493 (1977).
231. *MacKenzie S. L., Tenaschuk D.*, J. Chromatogr., **97**, 19—24 (1974).
232. *MacKenzie S. L., Tenaschuk D.*, J. Chromatogr., **171**, 195—208 (1979).
233. *MacKenzie S. L., Tenaschuk D.*, J. Chromatogr., **173**, 53—63 (1979).
234. *Madar D. A., Willis R. A., Koehler K. A., Hiskey R. G.*, Anal. Biochem., **92**, 466—472 (1979).
235. *Magnusson S., Sottrup-Jensen L., Petersen T. E., Morris H. R., Dell A.*, FEBS Lett, **44**, 189—193 (1974).
236. *Mahoney W. C., Hermodson M. A*, J Biol. Chem., **255**, 11199—11203 (1980).
237. *Mahuran D., Clements P., Carrella M., Strasberg P. M.*, Anal. Biochem., **129**, 513—516 (1983).
238. *Makkar H. P. S., Sharma O. P., Negi S. S.*, Anal. Biochem., **104**, 124—126 (1980).
239. *March J. F.*, Anal. Biochem., **69**, **420—442** (1975).
240. *Marciani D. J., Wilkie S. D., Schwartz C. L*, Anal. Biochem., **128**, 130—137 (1983).
241. *Marshall T.*, Electrophoresis, **4**, 269—272 (1983).
242. *Marshall T.*, Anal. Biochem., **136**, 340—346 (1984).
243. *Marshall T.*, Electrophoresis, **5**, 245—250 (1984).
244. *Marshall T., Latner A. L.*, Electrophoresis, **2**, 228—235 (1981).
245. *Mather I. H., Tamplin C. B.*, Anal. Biochem., **93**, 139—142 (1979).
246. *Matsubara H., Sasaki R. M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **35**, 175—181 (1969).
247 *Matsu-ura S., Yamamoto S., Makita M.*, Anal. Biochem., **114**, 371—376 (1981).
248. *McGuire J., Taylor P., Greene L. A.*, Anal. Biochem., **83**, 75—81 (1977).
249. *McKnight G. S.*, Anal. Biochem., **78**, 86—92 (1977).
250. *McNeil M., Darvill A. G., Åman P., Franzén L.-E., Albersheim P.*, Methods Enzymol., **83**, 3—45 (1982).
251. *Means G. E., Feeney R. E.*, Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, San Francisco, 1971.
252. *Merril C. R., Switzer R. C., Van Keuren M. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76**, 4335—4339 (1979).
253. *Merril C. R., Dunau M. L., Goldman D.*, Anal. Biochem., **110**, 201—207 (1981).
254. *Merril C. R., Goldman D., Sedman S. A., Ebert M. H.*, Science, **211**, 1437—1438 (1981).
255. *Merril C. R., Goldman D., Van Keuren M. L.*, Electrophoresis, **3**, 17—23 (1982).
256. *Merril C. R., Harrington M., Alley V.*, Electrophoresis, **5**, 289—297 (1984).
257. *Mokrasch L. C.*, Anal. Biochem., **18**, 64—71 (1967).
258. *Mokrasch L. C.*, Anal. Biochem., **36**, 273—277 (1970).
259. *Mold D. E., Weingart J., Assaraf J., Lubahn D. B., Kelner D. N., Shaw B. R., McCarty K. S.*, Sr., Anal.Biochem., **135**, 44—47 (1983).
260. *Moodie I. M., Burger J.*, J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **4**, 218—223 (1981).
261 *Moodie I. M., Walsh D. L., Burger J. A.*, J. Chromatogr., **261**, 146—152 (1983).
262. *Moore S.*, J. Biol. Chem., **238**, 235—237 (1963).

263. *Moore S., Stein W. H.*, J. Biol. Chem., **192**, 663—681 (1951).
264. *Moore S., Stein W. H.*, J. Biol. Chem., **211**, 893—906 (1954).
265. *Moore S., Stein W. H.*, J. Biol. Chem., **211**, 907—913 (1954).
266. *Moore S., Stein W. H.*, Methods Enzymol., **6**, 819—831 (1963).
267. *Moore S., Spackman D. H., Stein W. H.*, Anal. Chem., **30**, 1185—1190 (1958).
268. *Morrice N., Aitken A.*, Anal. Biochem., **148**, 207—212 (1985).
269. *Morrissey J. H.*, Anal. Biochem., **117**, 307—310 (1981).
270. *Murayama K., Shindo N.*, J. Chromatogr., **143**, 137—152 (1977).
271. *Murphy J. B., Kies M. W.*, Biochim. Biophys. Acta, **45**, 382—384 (1960).
272. *Nabi S. A., Farooqui W. U., Ziddiqui Z. M., Rao R. A. K.*, J. Liquid Chromatogr., **6**, 109—122 (1983).
273. *Narita K.*, Biochem., Biophys. Acta, **28**, 184—191 (1958).
274. *Neuhoff V.*, Electrophoresis, **5**, 251 (1984).
275. *Neumann N. P.*, Methods Enzymol., **25**, 393—400 (1972).
276. *Nguyen N. Y., Chrambach A.*, J. Biochem., Biophys. Methods, **1**, 171—187 (1979).
277. *Nguyen N. Y., Di Fonzo J., Chrambach A.*, Anal. Biochem., **106**, 78—91 (1980).
278. *Nice E. C., Capp M., O'Hare M. J.*, J. Chromatogr., **185**, 413—427 (1979).
279. *Nikodijevic O., Nikodijevic B., Zinder O., Yu M.-Y. W., Guroff G., Pollard H. B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**, 771—774 (1976).
280. *Nishio K., Kawakami M.*, Anal. Biochem., **126**, 239—241 (1982).
281. *Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R.*, Anal. Biochem., **105**, 361—363 (1980).
282. *Ochs D. C., McConkey E. H., Sammons D. W.*, Electrophoresis, **2**, 304—307 (1981).
283. *Öfverstedt L. G., Johansson G., Fröman G., Hjerten S.*, Electrophoresis, **2**, 168—173 (1981).
284. *Ohnishi S. T., Barr J. K.*, Anal. Biochem., **86**, 193—200 (1978).
285. *Ohsawa K., Ebata N.*, Anal. Biochem., **135**, 409—415 (1983).
286. *Olert J., Sawatzki G., Kling H., Gebauer J.*, Histochemistry, **60**, 91—99 (1979).
287. *Parham M. E., Loudon G. M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **80**, 1—6 (1978).
288. *Pasieka A. E., Borowiecki M. T.*, Biochim. Biophys. Acta, **111**, 553—556 (1965).
289. *Pearce R. J.*, J. Chromatogr., **136**, 113—126 (1977).
290. *Pecci L., Cavallini D.*, Anal. Biochem., **118**, 70—75 (1981).
291. *Pelley J. W., Garner C. W., Little G. H.*, Anal. Biochem., **86**, 341—343 (1978).
292. *Penke B., Ferenczi R., Kovács K.*, Anal. Biochem., **60**, 45—50 (1974).
293. *Perham P. N.*, Nechniques for determining the amino composition and sequence in proteins, in Techniques in Protein & Enzyme Biochemistry, B110, Elevier/North-Holland, Shannon, 1974, pp. 1—39.
294. *Perini F., Peters B. P.*, Anal. Biochem., **123**, 357—363 (1982).
295. *Perret B. A., Felix R., Furlan M., Beck E. A.*, Anal. Biochem., **131**, 46—50 (1983).
296. *Perry T. L., Stedman D., Hansen S.*, J. Chromatogr., **38**, 460—466 (1968).
297. *Peterson E. A., Sober H. A.*, Anal. Chem., **31**, 857—862 (1959).
298. *Peterson G. L.*, Anal. Biochem., **83**, 346—356 (1977).
299. *Peterson G. L.*, Anal. Biochem., **100**, 201—220 (1979).
300. *Pfeifer R. F., Hill D. W.*, Adv. Chromatogr., **22**, 37—69 (1983).
301. *Phillips D. M. P.*, Biochem. J., **86**, 397 (1963).
302. *Phillips R. D.*, Anal. Biochem., **113**, 102—107 (1981).
303. *Pierce J., Suelter C. H.*, Anal. Biochem., **81**, 478—480 (1977).
304. *Plummer T. H., Jr.*, Anal. Biochem., **73**, 532—534 (1976).

305. *Poehling H.-M., Neuhoff V.*, Electrophoresis, **2**, 141—147 (1981).
306. *Pollard H. B., Menard R., Brandt H. A., Pazoles C. J., Creutz C. E., Ramu A.*, Anal. Biochem., **86**, 761—763 (1978).
307. *Porro M., Viti S., Antoni G., Saletti M.*, Anal. Biochem, **127**, 316—321 (1982)
308. *Posner I.*, Anal. Biochem., **70**, 187—194 (1976).
309. *Radolo B. J.*, Electrophoresis, **1**, 43—56 (1980).
310. *Rash J. J., Gehrke C. W., Zumwalt R. W., Kuo K. C., Kvenvolden K. A., Stalling D. L.*, J. Chromatogr. Sci., **10**, 444—450 (1972).
311. *Reisner A. H., Nemes P., Bucholtz C.*, Anal. Biochem., **64**, 509—516 (1975).
312. *Riddles P. W., Blakeley R. L., Zerner B.*, Anal. Biochem., **94**, 75—81 (1979).
313. *Righetti P. G., Chillemi F.*, J. Chromatogr., **157**, 243—251 (1978).
314. *Riordan J. F., Giese R. W.*, Methods Enzymol., **47**, 31—40 (1977).
315. *Roach D., Gehrke C. W.*, J. Chromatogr., **43**, 303—310 (1969).
316. *Roach D., Gehrke C. W.*, J. Chromatogr., **44**, 269—278 (1969).
317. *Roach D., Gehrke C. W.*, J. Chromatogr., **52**, 393—404 (1970).
318. *Robel E. J.*, Anal. Biochem., **18**, 406—413 (1967).
319. *Rose I. A.*, Methods Enzymol., **1**, 591—595 (1955).
320. *Roth M.*, Anal. Chem., **43**, 880—882 (1971).
321. *Roth M., Hampaï A.*, J. Chromatogr., **83**, 353—356 (1973).
322. *Rothberg P. G., Harris T. J. R., Nomoto A., Wimmer E.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S.A , **75**, 4868—4872 (1978).
323. *Rubin R. W., Warren R. W.*, Anal. Biochem , **83**, 773—777 (1977).
324. *Sammons D. W., Adams I. D., Nishizawa E. E.*, Electrophoresis, **2**, 135—141 (1981).
325. *Sarges R., Witkop B.*, J. Am Chem. Soc., **86**, 1861—1862 (1964).
326. *Satoh K., Busch H.*, Cell Biol. Int. Rep., **5**, 857—866 (1981).
327. *Savoy C. F., Heinis J. L., Seals R. G*, Anal. Biochem., **68**, 562—571 (1975).
328. *Schleicher M., Watterson D. M.* Anal. Biochem., **131**, 312—317 (1983).
329. *Schmer G., Kreil G.*, Anal. Biochem., **29**, 186—192 (1969).
330. *Schmidt G. J., Olson D. C., Slavin W.*, J. Liquid Chromatogr., **2**, 1031—1045 (1979).
331. *Schmitt H. W., Walker J. E.*, FEBS Lett , **81**, 403—405 (1977).
332. *Schroeder W. A., Cua J. T., Matsuda G., Fenninger W. D.*, Biochim. Biophys. Acta, **63**, 532—534 (1962).
333. *Scoffone E., Fontana A.*, Mol. Biol. Biochem. Biophys., **8**, 162—203 (1975).
334. *Scoffone E., Fontana A., Rocchi R*, Biochemistry, **7**, 971—979 (1968).
335. *Scopes R. K.*, Anal. Biochem , **59**, 277—282 (1974).
336. *Sedmak J. J., Grossberg S. E.*, Anal. Biochem., **79**, 544—552 (1977).
337. *Shelton J. R., Rogers K. S.*, Anal. Biochem., **44**, 134—142 (1971).
338. *Sherma J., Sleckman B. P., Armstrong D. W.*, J Liquid Chromatogr., **6**, 95—108 (1983).
339. *Siezen R. J., Mague T. H.*, J Chromatogr., **130**, 151—160 (1977).
340. *Simmons W. H., Meisenberg G.*, J. Chromatogr., **266**, 483—489 (1983).
341. *Simons S. S., Jr., Johnson D. F.*, J. Am. Chem. Soc., **98**, 7098—7099 (1976)
342. *Simons S. S., Jr., Johnson D. F.*, Anal. Biochem., **82**, 250—254 (1977).
343 *Simpson R. J., Neuberger M. R., Liu T.-Y.*, J. Biol. Chem., **251**, 1936—1940 (1976).
344. *Smith I.*, In: Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Smith I. (Ed.), vol. 1, 3rd edn, Heinemann Medical Books, Bath, 1969, pp. 104—169.
345 *Soby L. M., Johnson P.*, Anal. Biochem., **113**, 149—153 (1981).
346 *Soodak M.*, Methods Enzymol , **3**, 266—269 (1957).
347. *Spackman D. H.*, Methods Enzymol., **11**, 3—15 (1967).
348 *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, Anal. Chem., **30**, 1190—1206 (1958).

349. *Spande T. F., Witkop B.*, Methods Enzymol., **11**, 498—506 (1967).
350. *Spector T.*, Andl. Biochem., **86**, 142—146 (1978).
351. *Spies J. R., Chambers D. C.*, Anal. Chem., **21**, 1249—1266 (1949).
352. *Stalling D. L., Gille G., Gehrke C. W.*, Anal. Biochem., **18**, 118—125 (1967).
353. *Steck G., Leuthard P., Bürk R. R.*, Anal. Biochem., **107**, 21—24 (1980).
354. *Stegink L. D.*, Anal. Biochem., **20**, 502—516 (1967).
355. *Steinbach L., Becker E. I.*, J. Am. Chem. Soc., **76**, 5808—5810 (1954).
356. *Suelter C. H., DeLuca M.*, Anal. Biochem., **135**, 112—119 (1983).
357. *Svasti J.*, Trends Biochem. Sci. (Pers. Edn.) 5 (1) VIII—IX (1980).
358. *Swarup G., Cohen S., Garbers D. L.*, J. Biol. Chem., **256**, 8197—8201 (1981).
359. *Switzer R. C. III, Merril C. R., Shifrin S.*, Anal. Biochem., **98**, 231—237 (1979).
360. *Szókán G.*, J. Liquid Chromatogr., **5**, 1493—1498 (1982).
361. *Tabor H., Tabor C. W.*, Anal. Biochem., **78**, 554—556 (1977).
362. *Tanford C., Roberts G. L.*, J. Am. Chem. Soc., **74**, 2509—2515 (1952).
363. *Tapuhi Y., Schmidt D. E., Lindner W., Karger B. L.*, Anal. Biochem., **115**, 123—129 (1981).
364. *Tasheva B., Dessev G.*, Anal. Biochem., **129**, 98—102 (1983).
365. *Thannhauser T. W., Konishi Y., Scheraga H. A.*, Anal. Biochem., **138**, 181—188 (1984).
366. *Tomlinson G., Viswanatha T.*, Anal. Biochem., **60**, 15—24 (1974).
367. *Torres A. R., Peterson E. A.*, Anal. Biochem., **98**, 353—357 (1979).
368. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76**, 4350—4355 (1979).
369. *Tower D. B.*, Methods Enzymol., **11**, 76—93 (1967).
370. *Trah T. J., Schleyer M.*, Anal. Biochem., **127**, 326—329 (1982).
371. *Trézl L., Rusznák I., Tyihák E., Szarvas T., Szende B.*, Biochem. J., **214**, 289—292 (1983).
372. *Tristram G. R., Smith R. H.*, Adv. Protein Chem., **18**, 227—318 (1963).
373. *Tsang V. C. W., Peralta J. M., Simons A. R.*, Methods Enzymol., **92**, Part E., 377—391 (1983).
374. *Turnell D. C., Cooper J. D. H.*, Clin. Chem., **28**, 527—531 (1982).
375. *Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigele M.*, Science, **178**, 871—872 (1972).
376. *Umagat H., Kucera P., Wen L.-F.*, J. Chromatogr., **239**, 463—474 (1982).
377. *Van Kley H., Hale S. M.*, Anal Biochem., **81**, 485—487 (1977).
378. *Van Sumere C., Geiger H., Bral D., Folckenier G., Vande Casteele K., Martens M., Hanselaer R., Gevaert L.*, Anal. Biochem., **131**, 530—532 (1983).
379. *Varghese G., Diwan A. M.*, Anal. Biochem., **132**, 481—483 (1983).
380. *Vesterberg O., Gramstrup-Christensen B.*, Electrophoresis, **5**, 282—285 (1984).
381. *Vitt S. V., Vorob'ev M. M., Paskonova E. A., Saporovskaya M. B.*, J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **6**, 158—160 (1983).
382. *Wachslicht H., Chrambach A.*, Anal. Biochem., **84**, 533—538 (1978).
383. *Waddell W. J.*, J. Lab. Clin. Med., **48**, 311—314 (1956).
384. *Wagner A. P., Psarrou E., Wagner L. P.*, Anal. Biochem., **129**, 326—328 (1983).
385. *Wagner A. P., Psarrou E., Wagner L. P.*, Anal. Biochem., **137**, 248—255 (1984).
386. *Wang C.-S., Smith R. L.*, Anal. Biochem., **63**, 414—417 (1975).
387. *Wang W.-T., Matsuura F., Sweeley C. C.*, Anal. Biochem., **134**, 398—405 (1983).
388. *Warburg O., Christian W.*, Biochemische Z., **310**, 384—421 (1941/42).
389. *Ward D. N., Coffey J. A.*, Biochemistry, **3**, 1575—1577 (1964).
390. *Ward D. N., Coffey J. A., Ray D. B., Lamkin W. M.*, Anal. Biochem., **14**, 243—252 (1966).

391. *Watanabe Y., Imai K.*, Anal. Chem., **55**, 1786—1791 (1983).
392. *Waterfield M. D., Scrace G. T.*, In: Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography, Hawk G. L. (Ed.), Chromatographic Science Series, vol. 18, Marcel Dekker, New York, Basel, 1981, pp. 135—158.
393. *Watters C.*, Anal. Biochem., **88**, 699—701 (1978).
394. *Weiner S., Tishbee A.*, J. Chromatogr., **213**, 501—506 (1981).
395. *Weinstein B.*, Methods Biochem., Anal., **14**, 203—323 (1966).
396. *Wessel D., Flügge U. I.*, Anal. Biochem., **138**, 141—143 (1984).
397. *Westall F., Hesser H.*, Anal. Biochem., **61**, 610—613 (1974).
398. *Westley J., Lambeth J.*, Biochem. Biophys. Acta, **40**, 364—366 (1960).
399. *Whitaker J. R., Granum P. E.*, Anal. Biochem., **109**, 156—159 (1980).
400. *Whitaker J. R., Granum P. E., Aasen G.*, Anal. Biochem., **108**, 72—75 (1980).
401. *Wilcox P. E.*, Methods Enzymol., **11**, 63—76 (1967).
402. *Williams R. J., Siggia S.*, Anal. Chem., **49**, 2337—2342 (1977).
403. *Wilkinson J. M.*, J. Chrom. Sci., **16**, 574—552 (1978).
404. *Wilkinson M., Iaccolucci G. A., Myers D. V.*, Anal. Biochem., **70**, 470—478 (1976).
405. *Wojtkowiak Z., Briggs R. C., Hnilica L. S.*, Anal. Biochem., **129**, 486—489 (1983).
406. *Wold F.*, Trends Biochem. Sci., **9**, 256—257 (1984).
407. *Wolf P., Maguire M.*, Anal. Biochem., **129**, 145—155 (1983).
408. *Wray D., Boulikas T., Wray V. P., Hancock R.*, Anal. Biochem., **118**, 197—203 (1981).
409. *Yamada S., Itano H. A.*, Biochem. Biophys. Acta, **130**, 538—540 (1966).
410. *Yamasaki R. B., Shimer D. A., Feeney R. E.*, Anal. Biochem., **111**, 220—226 (1981).
411. *Yamasaki R. B., Osuga D. T., Feeney R. E.*, Anal. Biochem., **126**, 183—189 (1982).
412. *Yang C.-Y., Wakil S. J.*, Anal. Biochem., **137**, 54—57 (1984).
413. *Yang J. C., Fujitaki J. M., Smith R. A.*, Anal. Biochem., **122**, 360—363 (1982).
414. *Yoshida A.*, Anal. Biochem., **49**, 320—325 (1972).
415. *Yoshida H., Sumida T., Masujima T., Imai H.*, J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **5**, 509—511 (1982).
416. *Yuen K. C. L., Johnson T. K., Denell R. E., Consigli R. A.*, Anal. Biochem., **126**, 398—402 (1982).
417. *Zamenhoff S.*, Methods Enzymol., **3**, 696—704 (1957).
418. *Zanetta J. P., Vincendon G.*, J. Chromatogr., **76**, 91—99 (1973).
419. *Ziegler Kl., Melchert I., Lürken C.*, Nature (Lond.), **214**, 404—405 (1967).
420. *Zimmerman C. L., Appella E., Pisano J. J.*, Anal. Biochem., **75**, 77—85 (1976).
421. *Zinder O., Nikodijevic O., Hoffman P. G., Pollard H. B.*, J. Biol. Chem., **251**, 2179—2181 (1976).
422. *Zumwalt R. W., Kuo K. C. T., Gehrke C. W.* (Eds.), Amino Acid Analysis by Gas Chromatography, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1986.

Глава 9

ЭНАНТИОМЕРНЫЙ АНАЛИЗ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

С. ВАЙНШТЕЙН (S. WEINSTEIN, *Department of Organic Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*), М. Х. ЭНГЕЛ (M. H. ENGEL, *School of Geology and Geophysics, The University of Oklahoma, Norman, OK 73019, U.S.A.*), П. Э. ХАРЕ (P. E. HARE, *Geophysical Laboratory, Carnegie Institution of Washington D.C., U.S.A.*)

9.1. Введение

Разделение аминокислот на оптические изомеры методами хроматографии высокого разрешения представляет большой интерес во многих областях исследования. Развивалось это направление энантиомерного анализа в нескольких лабораториях параллельно с совершенствованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Было предложено проводить разделение аминокислот на энантиомеры на полистирольных [2] и полиакриламидных [6] матрицах с ковалентно присоединенными к ним хиральными лигандами, образующими комплексы с ионами двухвалентной меди. Тот же принцип — ионы металла в комплексе с хиральными лигандами, но в подвижной фазе — был использован позднее в обращенно-фазовой хроматографии [4]. Описан эффективный и высокочувствительный метод анализа изомеров аминокислот в системе, где подвижной фазой служит водный раствор, содержащий комплекс Cu(II)-L-пролин, а стационарной фазой — катионообменная смола или силикагель с обращенной фазой. Однако таким способом осуществить полное разделение на энантиомеры всех аминокислот не удалось [3, 5], оно было достигнуто на их дансильных производных в двухколоночной системе [8].

Дальнейший прогресс в этой области связан с синтезом серии N,N-диалкиламинокислот и их применении в комплексах с ионами Cu(II) в качестве хиральных фаз [9, 10]. В приведенной ниже методике методом ОФ-ВЭЖХ на хиральном комплексе N,N-ди-*н*-пропил-L-аланинацетат меди (Cu-ДПА) удалось разделить на энантиомеры все белковые аминокислоты. Для улучшения разрешения хроматографию проводят в две стадии. На первой стадии смесь аминокислот предварительно разделяется на группы на катионообменной колонке в условиях, аналогичных используемым в обычном аминокислотном анализаторе, но в летучих буферах. Затем после упаривания растворителя каж-

дая группа подвергается энантиомерному анализу на ОФ-колонке с хиральной подвижной фазой. Обработка компонентов смеси после выхода с колонки *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола (ОФА-реагент) позволяет обнаруживать по флуоресценции субнаномолярные количества аминокислот. Пролин не реагирует с ОФА и может быть идентифицирован по реакции с нингидрином [7]. Анализ цистеина и цистина проводится после их окисления до цистеиновой кислоты, которая в описываемой методике хорошо разрешается с другими аминокислотами.

9.2. Реагенты

Для анализа используют коммерчески доступные реагенты, растворители перегоняют, воду очищают двойной перегонкой. N,N-Ди-*н*-пропил-L-аланин синтезируют по несколько видоизмененной методике [1].

9.2.1. Синтез N, N-ди-*н*-пропил-L-аланина

Суспендируют 0,2 моль (17,8 г) L-аланина (Sigma) в 200 мл этанола. Добавляют 3 г катализатора — палладий (10%) на активированном угле (Fluka) и 43 мл пропионового альдегида (Fluka). Смесь гидрируют 48 ч при 40—50 °С под исходным давлением водорода ~3,5 атм. Катализатор удаляют на стеклянном фильтре и фильтрат упаривают досуха. Продукт реакции N,N-ди-*н*-пропил-L-аланин перекристаллизовывают из хлороформа. Степень чистоты реагента контролируют методом тонкослойной хроматографии, ядерного магнитного резонанса и элементного анализа.

9.2.2. Растворы для ВЭЖХ

Буфер I. К 0,2 М раствору пиридина добавляют ледяную уксусную кислоту до pH 3,4.

Буфер II. К 0,4 М раствору пиридина добавляют ледяную уксусную кислоту до pH 5,3.

Реагент ОФА. 30 г борной кислоты растворяют в 1 л воды и добавляют KOH до pH 9,5—10 и затем 2,5 г ЭДТА. Растворяют 1,0 г *о*-фталевого альдегида и 0,5 мл меркаптоэтанола в 10 мл метанола и медленно приливают этот раствор к первому при размешивании. Полученную смесь фильтруют через фильтр Millipore (0,22 мкм).

Хиральная мобильная фаза. 8 мМ (1,384 г) N,N-ди-*н*-пропил-L-аланина и 4 мМ (0,8 г) ацетата меди растворяют в 1 л воды (pH 5,3—5,5), раствор фильтруют через тот же фильтр и деаэрируют в вакууме.

Таблица 9.1. Разделение аминокислот методом ВЭЖХ. Колонка: Spherisorb LC-18, 5 мкм, 150×4,6 мм, хиральная добавка: Cu(N,N-ди-*н*-пропил-L-аланин)$_2$

Аминокислота	Время удерживания[а], мин
Подвижная фаза: вода; скорость потока 0,2 мл/мин[б]	
D-Lys	3,4
L-Lys	4,4
D-Arg	5,2
L-Arg	8,4
Gly	6,4
D-Ser	6,8
L-Ser	8,4
D-Ala	7,0
L-Ala	10,0
D-Thr	7,8
L-Thr	9,6
D-His	10,4
L-His	13,8
D-Cya	12,3
L-Cya	13,6
D-Asp	21,0
L-Asp	24,6
D-Val	22,6
L-Val	54,2
D-Glu	40,0
L-Glu	70,2
D-Met	49,0
L-Met	86,6

Аминокислота	Время удерживания, мин
Подвижная фаза: 1%-ный водный ацетонитрил; скорость потока 0,2 мл/мин[б]	
Gly	3,8
D-Ala	4,2
L-Ala	6,2
D-Val	15,4
L-Val	38,6
D-Met	34,6
L-Met	62,6
D-Ile	45,4
L-Ile	121,4
D-Leu	49,0
L-Leu	112,6
Подвижная фаза: 14%-ный водный ацетонитрил; скорость потока 0,5 мл/мин[в]	
D-Tyr	2,7
L-Tyr	3,5
D-Phe	14,7
L-Phe	20,3
D-Trp	29,1
L-Trp	32,7
Подвижная фаза: 5%-ный водный ацетонитрил; скорость потока 0,25 мл/мин[г]	
D-Ala	2,5
L-Ala	3,1
D-Pro	4,5
L-Pro	10,5

[а] Время удерживания определялось отдельно для каждой аминокислоты с момента выхода свободного объема колонки V_0.

[б] Время выхода V_0 5 мин, определялось по появлению сигнала растворителя на хроматограмме.

[в] Время выхода V_0 3,7 мин.

[г] Ala и Pro каждый в отдельности разделены на колонке (150×4,6 мм) LC-18 (фирмы Supelco), для обнаружения использовалась реакция с нингидрином, а также измерение оптической плотности при 570 нм (Ala) и 440 нм (Pro). Время выхода V_0 5 мин.

9.3. ВЭЖХ

Смесь (по ~2 мг) каждой из рацемических аминокислот (табл. 9.1) растворяют в 10,0 мл воды. Вместо цистеина и цистина в смеси находится только цистеиновая кислота (Cya); пролин и гидроксипролин отсутствуют.

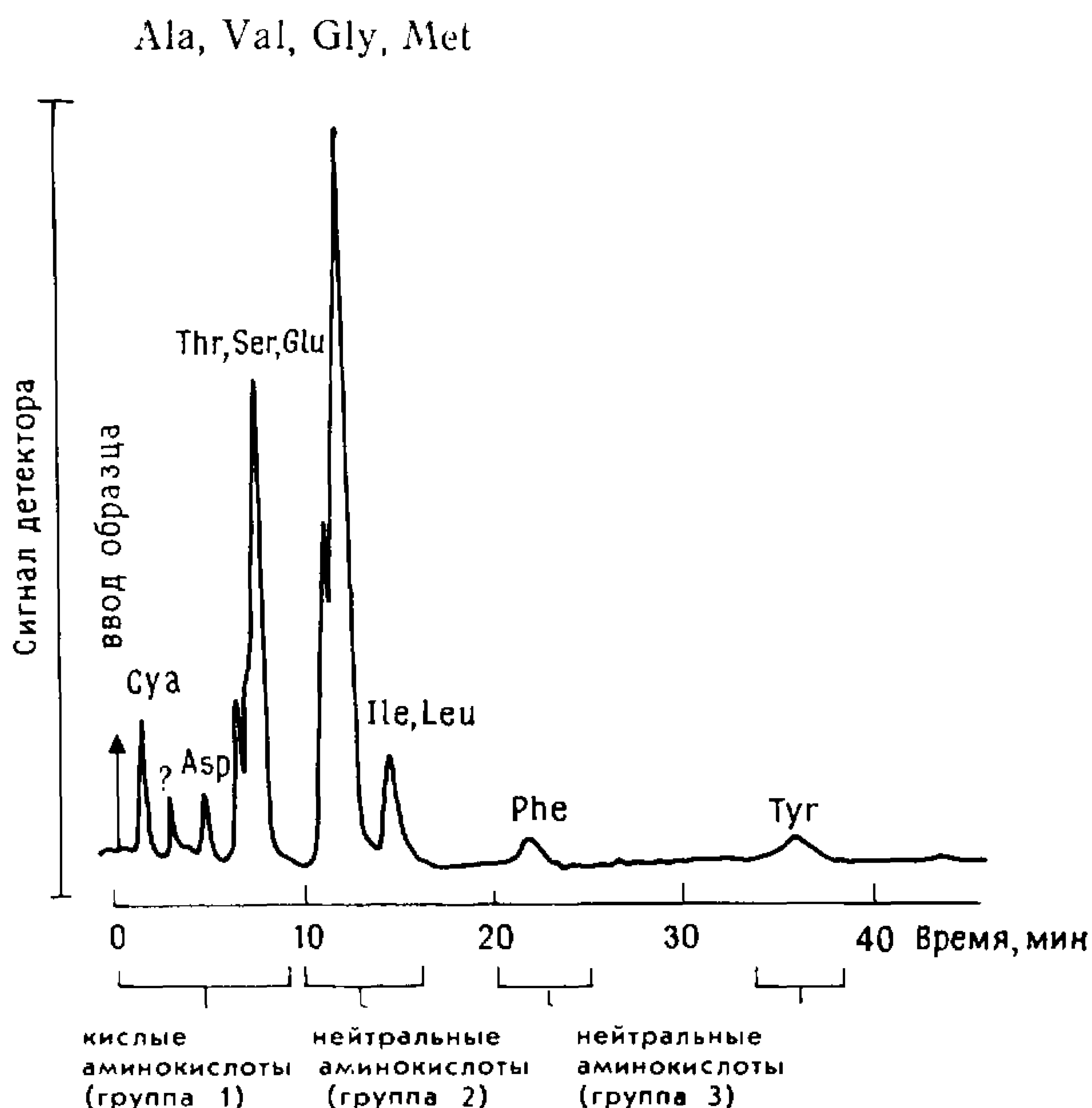


РИС. 9.1. Разделение кислых и нейтральных аминокислот на три группы на катионообменной колонке в 0,2 М пиридин-ацетатном буфере, pH 3,4. Через 45 мин 0,4 М буфером, pH 5,3, элюируются Trp, Lys, His, Arg. Температура 50 °С; скорость потока 0,17 мл/мин [9]. (С разрешения Academic Press.)

9.3.1. Разделение на группы

Аминокислоты делят на 4 группы:

1) кислые: Cya, Asp, Thr, Ser, Glu;
2) нейтральные: Gly, Ala, Val, Met, Leu, Ile;
3) ароматические: Phe, Tyr, Trp;
4) основные: Lys, His, Arg.

Вносят 20 мкл раствора аминокислот на колонку из нержавеющей стали (50×4,6 мм) с катионообменной смолой (5 мкм) типа полистиролдивинилбензолсульфокислота, уравновешенную буфером I. Первые три группы аминокислот, за исключением Trp, элюируют этим же буфером. На рис. 9.1 приведена хроматограмма и условия разделения. Буфер II используют для элюирования Trp, Lys, His и Arg. Элюат с колонки смешивается с ОФА-реагентом, поступающим со скоростью 0,6 мл/мин, и попадает в реакционную ячейку в виде спирали (для завершения реакции достаточно времени прохождения спирали), а затем в флуоресцентный детектор (Waters, 420 AC). Первый прогон позволяет установить точные времена удерживания аминокислот. Затем процедуру повторяют в идентичных условиях, но без

обработки компонентов реагентом и детектирования полученных производных. Аминокислоты собирают непосредственно на выходе с колонки в определенные временные интервалы, например кислые аминокислоты между 1 и 9 мин, нейтральные — 10—15 мин, другие аминокислоты — по отдельности, чтобы избежать больших объемов буферов (Phe 20—24 мин; Tyr 34—38 мин; Trp 62—66 мин, Lys 75—81 мин, His 84—89 мин, Arg 175—188 мин). Фракции Trp, Tyr и Phe объединяют; также поступают с фракциями His, Lys и Arg.

Для сокращения времени разделения исходная смесь аминокислот может быть разделена на колонке (50×2,0 мм) с использованием только буфера II (сразу от старта). Это приводит к более быстрому элюированию Trp, Lys, His и Arg. Все остальные аминокислоты элюируются совместно и далее могут быть разделены в буфере I.

Фракции элюата по группам аминокислот упаривают в токе азота и затем в течение 20 мин сушат в вакууме. Остаток растворяют в 200 мкл хиральной подвижной фазы для следующей стадии разделения.

9.3.2. Энантиомерный анализ

Аликвоту каждой фракции (20 мкл) вносят в колонку из нержавеющей стали (150×4,6 мм) с обращенной фазой Сферисорб ЛС-18 и хиральной подвижной фазой, где индивидуальные аминокислоты разделяются на D- и L-изомеры. В случае необходимости к элюенту добавляют ацетонитрил для уменьшения времени удерживания. Определение аминокислот в элюате осуществляется так же, как на стадии катионообменной хроматографии. Времена удерживания приведены в табл. 9.1.

Хроматограммы и условия разделения энантиомеров четырех групп аминокислот приведены на рис. 9.2—9.5. На специальных образцах, обогащенных L- и D-формами, показано, что во всех случаях без исключения D-изомер сходит с колонки раньше L-изомера.

Кислая (Ser, Thr, Cya, Asp, Glu) и основная (Lys, Arg, His) группы элюируются водным раствором, содержащим хиральную добавку. Для группы, состоящей из нейтральных аминокислот (Gly, Ala, Val, Met, Leu, Ile), к подвижной фазе добавляют ацетонитрил (1%) для уменьшения времени удерживания. Третья группа (Phe, Tyr, Trp) элюируется с добавлением 14% ацетонитрила.

Внутри каждой группы достигается полное разрешение энантиомеров всех аминокислот.

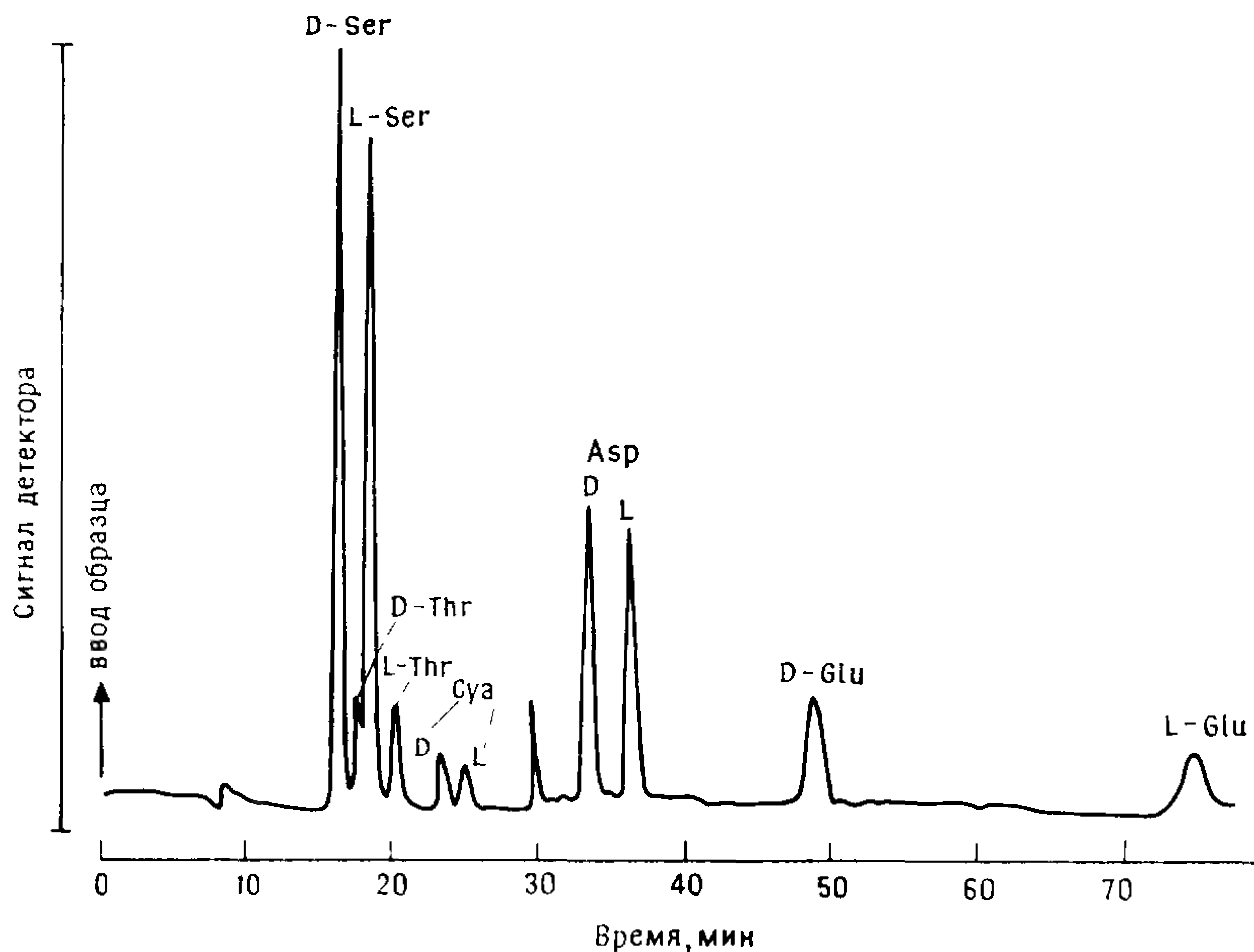


РИС. 9.2. Разделение кислых аминокислот (группа 1) на энантиомеры на колонке с обращенной фазой. Подвижная фаза: хиральная добавка (Cu-ДПА) в воде. Температура комнатная; скорость потока 0,1 мл/мин, через 30 мин — 0,2 мл/мин.

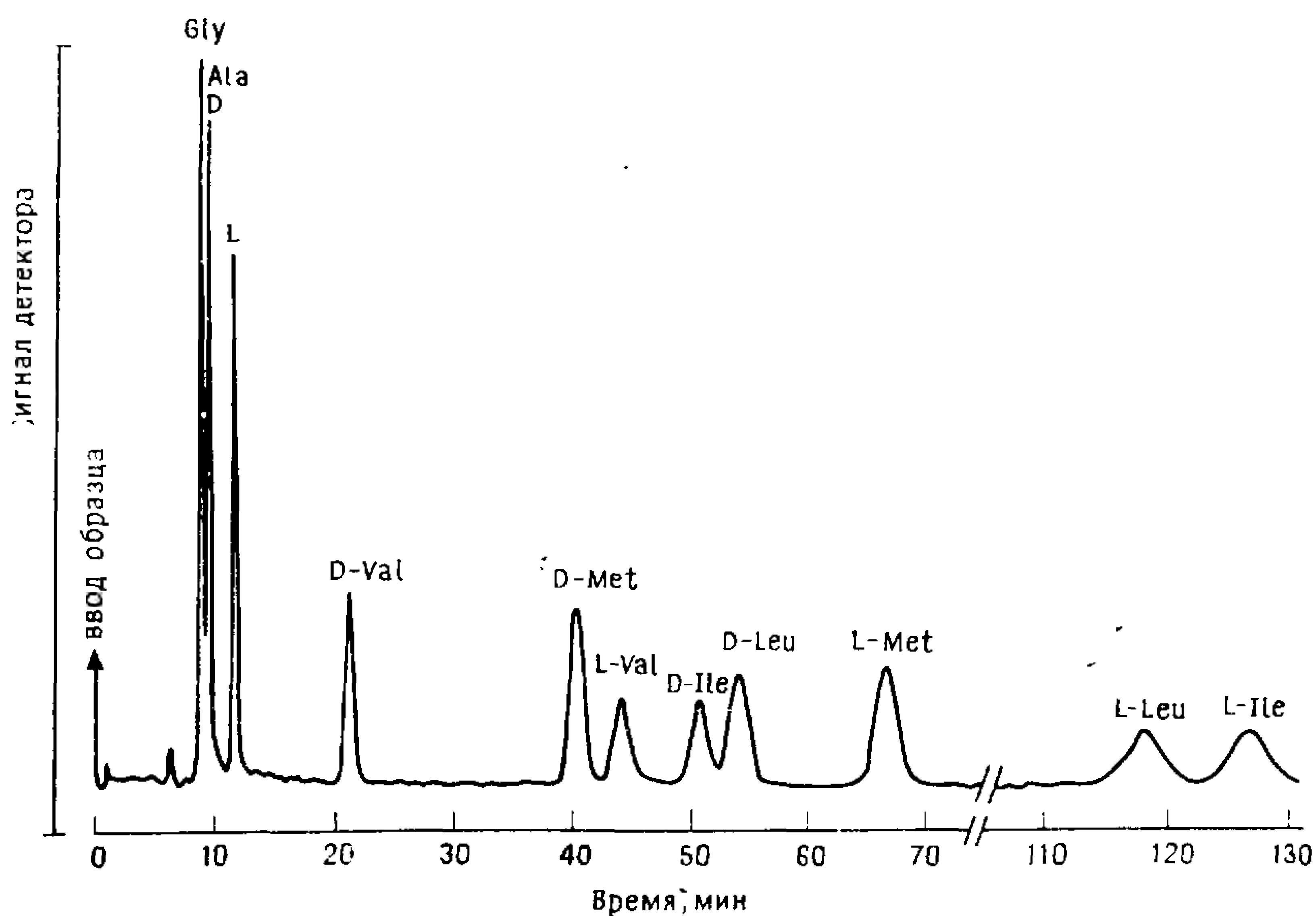


РИС. 9.3. Разделение нейтральных аминокислот (группа 2) на энантиомеры на колонке с обращенной фазой. Подвижная фаза: хиральная добавка (Cu-ДПА) в воде и водном ацетонитриле (1%-ный). Температура комнатная, скорость потока 0,25 мл/мин.

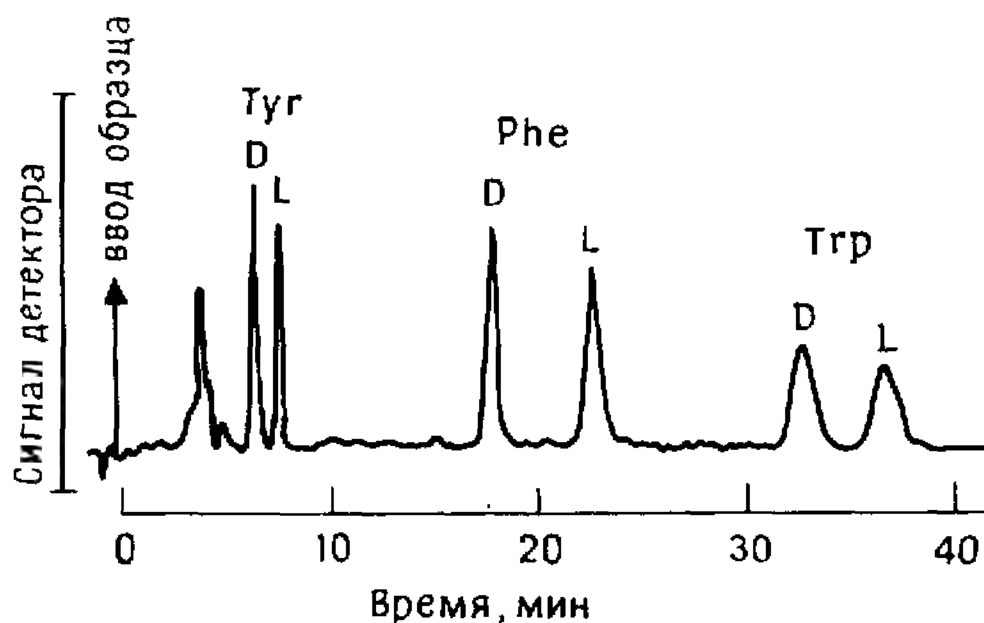


РИС. 9.4. Разделение ароматических аминокислот (Tyr, Phe и Trp) на энантиомеры на колонке с обращенной фазой. Подвижная фаза: хиральная добавка (Cu-ДПА) в воде и водном ацетонитриле (14%-ный). Температура комнатная, скорость потока 0,5 мл/мин.

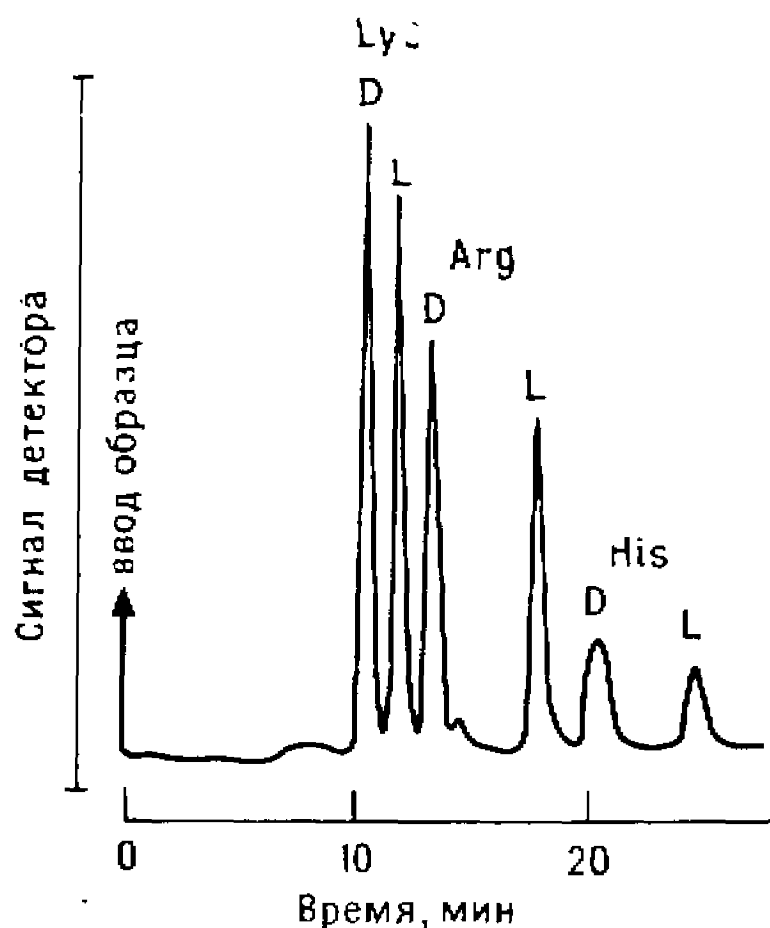


РИС. 9.5. Разделение основных аминокислот на энантиомеры на колонке с обращенной фазой. Подвижная фаза: хиральная добавка (Cu-ДПА) в воде. Температура комнатная, скорость потока 0,2 мл/мин.

9.4. Заключение

В любой лаборатории, имеющей хроматограф высокого разрешения с соответствующим детектором, легко наладить двустадийную хроматографическую систему для разделения аминокислот на энантиомеры. Можно использовать обычные продажные колонки без модификации. Повысить эффективность разделения можно с помощью создания градиента концентрации ацетонитрила, позволяющего анализировать одновременно нейтральные и ароматические аминокислоты, и установкой крана на выходе с колонки, отводящего большую часть элюата в коллектор и только небольшую — в детектор для определения.

В альтернативном варианте энантиомерного анализа с катионообменной смолы собирают каждую из аминокислот по отдельности в летучем буфере (0,1 М пиридин — ацетат, pH 3,1; затем 0,4 М пиридин — ацетат, pH 5,3) с последующим разделением на изомеры на обращенной фазе с хиральной добавкой (Engel, 1981, частное сообщение). В тех случаях, когда смесь содержит не все белковые аминокислоты, стадия ионообменной хроматографии может быть опущена.

Изменение конфигурации компонента хиральной добавки приводит к изменению порядка выхода с колонки D- и L-изомеров; результаты такого эксперимента могут дополнительно служить для подтверждения их соотношения. Изменение этого соотношения свидетельствует о наличии примесей в образце.

9.5. Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Э. Гиль-Ав за его поддержку и ценные советы.

Литература

1. *Bowman R. E., Stroud H. H.*, J. Chem. Soc., 1342—1345 (1950).
2. *Davankov V. A., Semechkin A. V.*, J. Chromatogr., **141**, 313—353 (1971).
3. *Gil-Av E., Tishbee A., Hare P. E.*, J. Am. Chem. Soc., **102**, 5115—5117 (1950).
4. *Gilon C., Leshem R., Tapuhi Y., Grushka E.*, J. Am. Chem. Soc., **101**, 7612—7613 (1979).
5. *Hare P. E., Gil-Av E.*, Science, **204**, 1226—1228 (1979).
6. *Lefebvre B. L., Audebert R., Quivoron C.*, Isr. J. Chem., **15**, 69—73 (1977).
7. *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, Anal. Chem., **30**, 1190—1206 (1958).
8. *Tapuhi Y., Miller N., Karger B. L.*, J. Chromatogr., **205**, 325—337 (1981).
9. *Weinstein S.*, Angew. Chem., **94**, 221—222 (1982).
10. *Weinstein S., Engel M. H., Hare P. E.*, Anal. Biochem., **121**, 370—377 (1982).

Глава 10

ТРАДИЦИОННАЯ СТРАТЕГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

Г. УИНТЕР (G. WINTER, *MRC Laboratory of Molecular Biology, Hill Road, Cambridge, CB2 2QH, U.K.*)

10.1. Введение

В основе всех современных методов определения аминокислотной последовательности пептидов лежит реакция Эдмана [19, 21]. На первой стадии этой реакции происходит присоединение фенилизотиоцианата (ФИТЦ) к α-аминогруппе пептида, затем от фенилтиокарбамильного (ФТК) производного под действием безводной кислоты отщепляется N-концевой остаток в виде 5′-тиазолинона и образуется укороченный пептид, содержащий в качестве N-концевой последующую аминокислоту (рис. 10.1). Избыток реагентов и побочных продуктов на промежуточных стадиях удаляется экстракцией органическими растворителями. Повторение этого процесса с одновременной идентификацией образующегося из тиазолинона фенилтиогидантоина (ФТГ) отщепляемой аминокислоты или N-концевого остатка укороченного пептида позволяет устанавливать аминокислотную последовательность исходного соединения.

Длина определяемой таким образом последовательности ограничена по причине постепенного уменьшения выходов продуктов на стадиях присоединения, расщепления и экстракции, возможного блокирования вновь образованного N-концевого остатка, протекания побочных реакций расщепления по остаткам аргинина и гистидина [58, 61] или по другим аминокислотным остаткам полипептидной цепи [39], а также по ряду других причин. Так, ФТК-производные пептидов в присутствии следов кислорода в реакционной среде десульфируются [33] и не расщепляются далее при обработке кислотой. Пептиды с N-концевыми остатками глутамина [4], триптофана [75] и различных производных цистеина [53, 68, 76] могут образовывать циклические продукты, что, как и возможная перегруппировка в случае последовательности Asn-Gly [20, 35, 72], а также O⟶N-ацильная миграция у остатков ацилсерина и ацилтреонина [20, 34, 69], приводит к блокированию процесса расщепления. Дополнительные осложнения возникают в случае трудно растворимых гидрофобных пептидов, которые не полностью вступают в реакцию конденсации и способны переходить в органическую фазу при экстракциях.

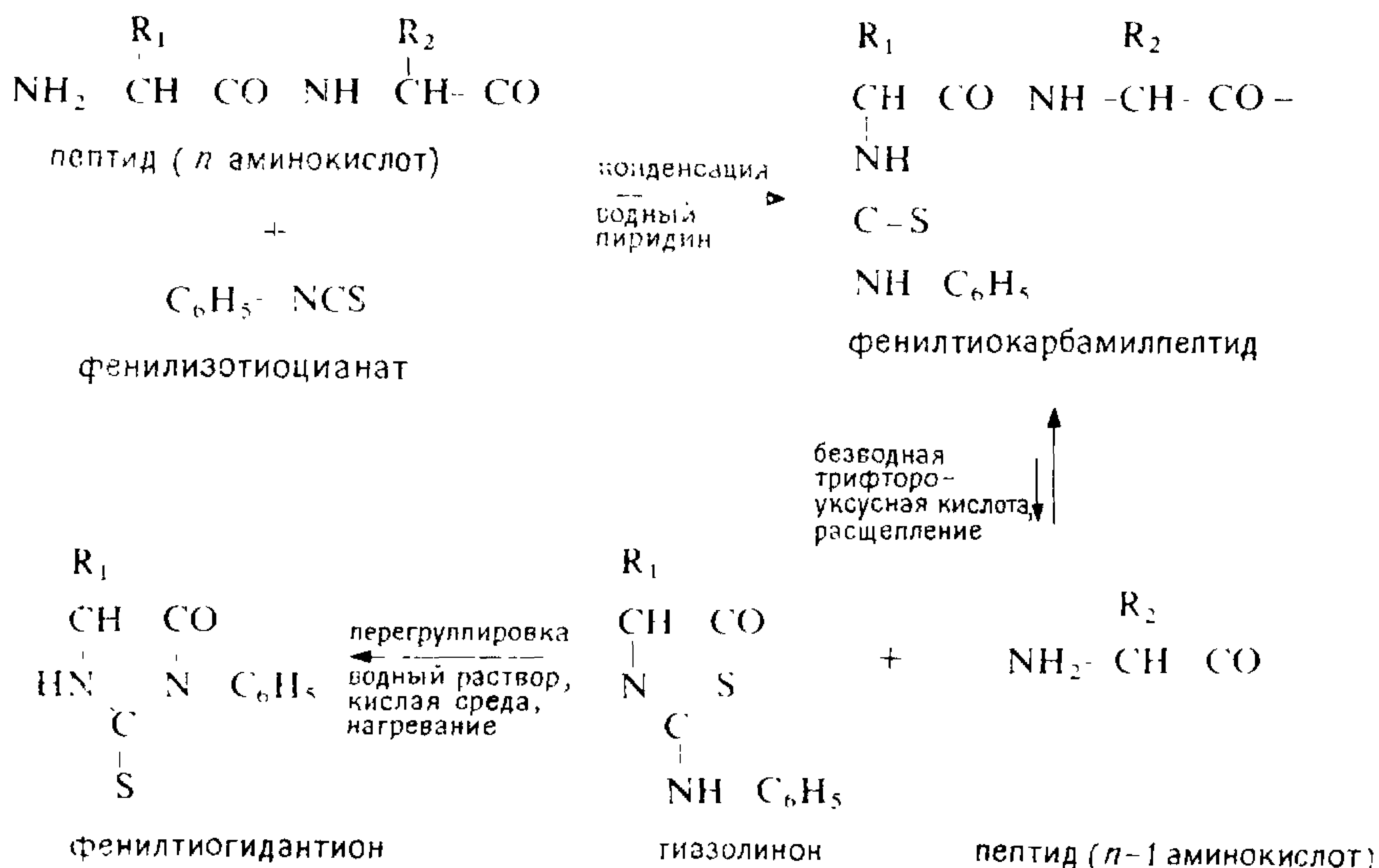


РИС. 10.1. Схема 1.

Выходы на стадиях классического («ручного») метода Эдмана обычно ниже, чем при использовании автоматических приборов, главным образом вследствие невозможности полного исключения кислорода из реакционной среды и менее эффективных промывок водной фазы. Поскольку реакция расщепления трифтороуксусной кислотой обратима [21] (рис. 10.1), присутствие тиазолинонов, неполностью экстрагированных на предыдущих стадиях, ингибирует процесс расщепления ФТК-пептида. В методике Хартли [26] в отличие от собственно метода Эдмана и его варианта с ДАБИТЦ- и ФИТЦ-реагентами [9] (гл. 14) часть пептида отбирается для дансилирования и последующей идентификации N-концевой аминокислоты (гл. 11), что ведет к дополнительному снижению постадийных выходов. По мере увеличения числа отщепленных аминокислот возрастает уровень фоновых «шумов», что затрудняет достоверное определение аминокислоты. Обычно этими методами удается устанавливать относительно короткие последовательности, содержащие до 15 остатков. Таким образом, совершенно очевидно, что расщепление на короткие пептиды — необходимая ступень структурного анализа белка при классическом подходе; оно осуществляется обычно с помощью ферментов и химических реагентов (в последнем случае образуются более крупные фрагменты).

10.2. Выбор стратегии исследования

На рис. 10.2 представлена стратегическая схема анализа структуры белка в одно- и двухстадийном вариантах. Исходный образец белка должен быть очищен до гомогенного состояния (не менее 95% степени чистоты); липиды, углеводы и кофакторы должны быть удалены.

Выбор протеолитических ферментов для первоначальной фрагментации (в одностадийном варианте) определяется молекулярной массой и аминокислотным составом белка, поскольку эти данные позволяют предсказать среднестатистический размер пептидов, образующихся при гидролизе (например, трипсином по остаткам лизина и аргинина). Обычно используют наиболее специфичные ферменты — трипсин, химотрипсин, стафилококковую протеазу, протеазу из *A. mellea* (табл. 10.1). Для того чтобы избежать трудностей, связанных с разделением гидролизата крупного белка, содержащего значительное число (>40) пептидов, применяют блокирование некоторых потенциальных точек расщепления полипептидной цепи или используют двухстадийную схему анализа. Так, расщепление трипсином по остаткам лизина может быть предотвращено путем модификации последних малеиновым ангидридом [8]. После проведения триптического гидролиза модифицированные фрагменты перед их разделением (ионообменной хроматографией или электрофорезом) деблокируют обработкой кислотой. Соответственно пептидные связи, образованные остатками аргинина, могут быть защищены от действия трипсина предварительной обработкой белка циклогександионом в присутствии бората [48]. Необходимым условием успешного применения этого подхода является достижение полноты модификации и последующего удаления защитных групп. Техника блокирования в соединении с методами диагонального электрофореза [8, 48, 49] используется для селективного выделения триптических пептидов, содержащих внутренние остатки лизина или аргинина. Альтернативным вариантом для первичной фрагментации полипептидной цепи только по остаткам аргинина или лизина служит применение специфических ферментов — клострипаина [43] и протеазы из *A. mellea* [65] соответственно.

В двухстадийной схеме анализа для получения крупных фрагментов белка используют либо химические методы расщепления (табл. 10.2) по таким сравнительно редко встречающимся в полипептидной цепи аминокислотам, как триптофан, метионин, цистеин, либо ограниченный протеолиз нативного белка [36, 40, 51, 52]. Повторная фрагментация каждого из образовавшихся крупных пептидов приводит к образованию значительно меньшего числа компонентов, чем в случае целой

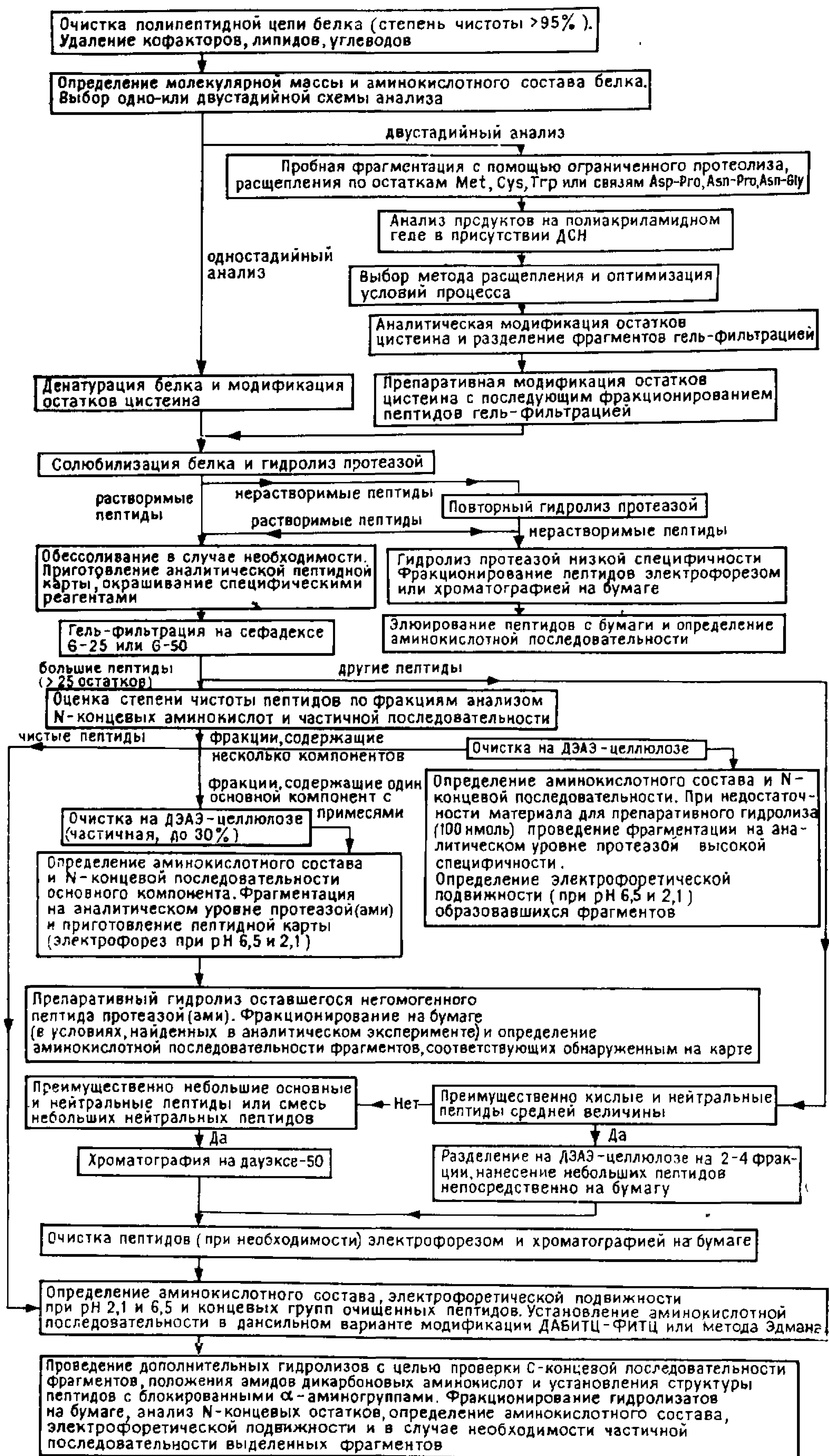


РИС. 10.2. Стратегия определения аминокислотной последовательности (неавтоматическими методами).

Таблица 10.1. Специфичность действия протеаз

Фермент	Остатки X, по которым в основном проявляется действие протеазы	Примечания
Трипсин	Остатки основных аминокислот: по С-концу Lys, Arg и аминоэтил-Cys [67]	Гидролиз не проходит по связям X-Pro; менее эффективен, если перед или после X находится кислый остаток; более селективен к Arg в щелочной области pH [22]; протекает в 2 *М* мочевине
Химотрипсин	Остатки ароматических аминокислот: по С-концу Trp, Tyr, Phe, Leu [67]	Гидролиз не проходит по связям X-Pro и окисленному Trp; менее эффективен, если перед или после X находится кислый остаток; протекает в 2 *М* мочевине
Эластаза	Остатки алифатических аминокислот: Ala, Val, Gly, Ser [27]	При условии частичного расщепления точки гидролиза непредсказуемы; гидролиз проходит в 2 *М* мочевине
Стафилококковая протеаза	Остатки кислых аминокислот: по С-концу Glu и Asp [15, 16, 32]	Могут быть подобраны условия гидролиза только по Glu или по Glu и Asp; гидролиз проходит также по карбоксиметил-Cys; менее эффективен, если за X стоит остаток с разветвленной боковой цепью или если X находится в окружении кислых аминокислот; протекает в 4 *М* мочевине [15]
Термолизин	N-конец Ile, Leu, Val, Phe [29, 41, 42]	Гидролиз не проходит по связям X-Pro; протекает при 60—80 °С, что может способствовать растворению пептида
Пепсин	Остатки ароматических аминокислот: по N-концу Trp, Tyr, Phe, Leu [67]	Расщепляет также многие другие связи; кислые условия гидролиза могут способствовать растворению пептида
Протеаза из *Armillaria mellea*	По N-концу Lys и аминоэтил-Cys [65]	Гидролизует также по другим остаткам, например N-концу Arg, Phe, Trp (G. Winter, неопубликованные данные) и С-концу Arg [13]

молекулы белка, что значительно упрощает дальнейшее фракционирование. Однако достижение полного и специфического расщепления белка химическим реагентом, успешное осуществление разделения крупных фрагментов и, наконец, нахождение порядка их расположения в цепи в свою очередь может вызывать заметные затруднения. Например, бромоциан расщепляет

Таблица 10.2. Химические методы расщепления, применяемые в двустадийной схеме анализа

Реагент	Основная специфичность	Частичное расщепление	Побочные расщепления
Бромоциан [23]	По Met с образованием С-концевых остатков гомосерина и гомосеринлактона; последний устойчив к действию карбоксипептидаз	Не расщепляется связь Met-оксид; частично расщепляются связи Met-Ser, Met-Thr [62], Met-(Cys-Cys) [14] и Met-Glu [10]	Кислотное расщепление по связям Asp-Pro и Asn-Pro [50] и окислительное расщепление по Trp [3]
2-Нитро-5-тиоцианобензойная кислота с последующим щелочным расщеплением [11]	По Cys с образованием N-концевого 4-карбоксиминотиазолидина, блокирующего реакцию Эдмана и действие аминопептидаз; возможно деблокирование каталитическим восстановлением [57]	Образование смешанных дисульфидов [54] и β-элиминирование S-цианопроизводного [70]	Связи Phe-Thr и Phe-Ser при использовании каталитического восстановления для деблокирования N-концевого остатка [57]
Гидробромид диметилсульфоксида [56] или N-хлорсукцинимид [64]	По Trp с образованием С-концевого лактона; Cys и Met окисляются		
BrCN в муравьиной и гептафтормасляной кислоте [47]	По Trp при условии предварительного фотокисления Met		
Гидроксиламин [5]	По Asn-Gly	Степень расщепления зависит от предварительного пребывания пептида в кислых или щелочных условиях [38]	Связи Asn-Leu [6] и Asn-Ala [71]
Разбавленная кислота [50]	По Asp-Pro и Asn-Pro		

пептидную цепь по остаткам метионина с превращением их в остатки гомосерина, при этом окисленная форма метионина — метионинсульфоксид устойчива к действию реагента, а связи Met-Ser и Met-Thr расщепляются лишь частично. В условиях кислотного гидролиза лабильных связей Asp-Pro триптофан подвергается окислительной деструкции и частично разрушаются амиды дикарбоновых аминокислот. Получаемые химическими методами крупные денатурированные полипептиды часто плохо растворимы и не элюируются с ионообменных колонок. Многообразие заряженных форм каждого пептида, возникающее в результате частичного деамидирования или образования смесей пептидов с С-концевыми остатками гомосерина и гомосеринлактона, усложняет их разделение по зарядам. Для реконструкции полипептидной цепи из бромоциановых фрагментов необходимо выделение всех метионинсодержащих пептидов из другого гидролизата исходного белка.

Многих из затруднений можно предусмотрительно избежать. Так, до проведения гидролиза остатки метионинсульфоксида могут быть восстановлены до метионина обработкой белка 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитом в денатурирующих условиях. Следует иметь в виду, что метионинсульфоксид не обнаруживается в белке аминокислотным анализом, поскольку в условиях кислотного гидролиза восстанавливается до метионина, однако он может быть определен непрямыми методами [63]. Смесь пептидов с С-концевыми остатками гомосерина и гомосеринлактона может быть превращена в любую из этих форм [2, 45].

Для растворения и разделения крупных пептидов могут быть использованы 8 М мочевина с последующей ионообменной хроматографией в этом же растворе [25] или 100%-ная муравьиная кислота с гель-фильтрацией на биогелях в 20—70%-ной муравьиной кислоте [1]. Солюбилизация достигается также модификацией остатков лизина в пептидах цитраконовым ангидридом; фракционирование проводится на колонках с биогелем или сефадексом при нейтральных pH.

На заключительных стадиях анализа может быть осуществлен целенаправленный поиск пептидов, необходимых для соединения крупных фрагментов, так называемых «перекрывающих» пептидов. Например, метионинсодержащие пептиды могут быть селективно выделены с помощью диагонального электрофореза [73]. Наилучший способ идентификации цистеинсодержащих пептидов заключается в предварительном мечении остатков цистеина [^{14}C]иодоуксусной кислотой с последующим целенаправленным выделением радиоактивных фрагментов [78, 79]. Пептиды, содержащие триптофан, обнаруживают в пиках хроматограмм по наибольшему поглощению при A_{280} и по присущей

ему флуоресценции или специфическому окрашиванию при хроматографии на бумаге.

Поскольку гель-фильтрация дает безусловно лучшие выходы при разделении крупных пептидов, чем ионообменная хроматография, оптимальный метод расщепления белка в двухстадийном анализе (рис. 10.2) удобно выбирать на основе результатов аналитического электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДНС). При четком разделении полос в геле целесообразно для препаративного фракционирования пептидов применять гель-фильтрацию. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН используется также для контроля полноты процесса расщепления белка химическими реагентами.

10.3. Ферментативный гидролиз

До проведения ферментативного гидролиза образец белка должен быть денатурирован и остатки цистеина в нем превращены в гидрофильные производные. С этой целью дисульфидные связи в белке предварительно восстанавливают дитиотреитом [37] и цистеины модифицируют иодоуксусной кислотой (для введения радиоактивной метки используют [^{14}C]иодоуксусную кислоту), иодоацетамидом [31], этиленимином [66] или окисляют надмуравьиной кислотой [30]. Выбор реагента определяется общей стратегией исследования. Более подробно реакции модификации рассмотрены в гл. 2.

Обработка надмуравьиной кислотой приводит к окислению кроме остатков цистеина также остатков метионина и триптофана и обычно дает более растворимые продукты, чем восстановительное алкилирование. Для создания в белке дополнительных связей, подвергающихся гидролизу трипсином или протеазой *A. mellea*, применяют аминоэтилирование остатков цистеина.

В идеальном случае в результате протеолитического расщепления каждый участок полипептидной цепи будет представлен в гидролизате одним единственным пептидом, образовавшимся с максимально возможным выходом. Реально такое положение не достигается, поскольку каждая протеаза в отдельных участках полипептидной цепи проявляет различную степень сродства и гидролизует связи с различной скоростью. Однако можно ограничить процесс протеолиза точками наибольшего сродства. В общем случае это достигается путем уменьшения соотношения фермент : субстрат или путем увеличения объема добавленного буферного раствора; сокращение времени гидролиза также приводит к увеличению выхода фрагментов, образующихся в результате быстрого расщепления по наиболее «активным» точ-

Таблица 10.3. Условия гидролиза белков некоторыми протеазами (37 °C)[a]

Фермент	Соотношение фермент : субстрат (масс./масс.)	Время, ч
Трипсин	1/100	2
Химотрипсин	1/50+1/100 ингибитор трипсина (из бобов сои)	2
Эластаза	1/100	2
Стафилококковая протеаза	1/30	4
Протеаза из *Almillaria mellea*	1/100	4

[a] Концентрация белка-субстрата 1 мг/мл в 0,5% (по весу) аммоний бикарбонате, pH 8,0. Аналогичные условия могут быть использованы для гидролиза очищенных пептидов (1 мкм/мл). Условия фрагментации пептидов термолизином: 1/100 60 °C, 2 ч; пепсином — 1/100, 37 °C 4 ч в 5%-ной муравьиной кислоте.

кам. «Мягкие» условия гидролиза белков для нескольких протеолитических ферментов приведены в табл. 10.3. Протеолитическое расщепление может проводиться под контролем с помощью pH-стата [18]: прекращение поглощения кислоты или основания свидетельствует о завершении процесса.

Причиной «неспецифичности» расщепления данным ферментом может быть наличие в нем примесей других протеаз. Например, трипсин может содержать примесь химотрипсина, от которой освобождаются с помощью аффинной хроматографии, а триптическая активность в химотрипсине подавляется добавлением ингибитора трипсина перед проведением гидролиза.

Обычно денатурированный белок нерастворим в аммонийбикарбонатном буфере, применяемом для протеолиза, и должен предварительно солюбилизироваться или по крайней мере превращаться в тонкую суспензию. Для этого лиофилизованный препарат белка растворяют в минимальном объеме денатурирующего агента (6 М гуанидинхлорид, 8 М мочевина, 100%-ная муравьиная кислота или концентрированный водный аммиак) и разбавляют значительно большим объемом буферного раствора. Гидролиз трипсином, химотрипсином, эластазой можно проводить в 2 М растворе мочевины [24], а стафилококковой протеазой в 4 М мочевине [15]. Если для растворения белка использовались муравьиная кислота или аммиак, то буферный раствор соответственно подщелачивают аммиаком или подкисляют муравьиной кислотой до pH 8 (поскольку формиат аммония летучее соединение, то в последующем обессоливании нет необходимости). Применение мочевины и особенно гуанидинхлорида требует проведения обессоливания на одной из заключительных стадий.

Контроль за ходом процесса протеолиза в суспензии может осуществляться измерением поглощения образовавшихся пептидов в небольшой пробе супернатанта (после отделения осадка) при 280 нм или определением радиоактивности [^{14}C]карбоксиметилцистеина. О завершении гидролиза судят по исчезновению полосы исходного белка в полиакриламидном геле. Во время проведения анализа основную массу гидролизата хранят при −20 °C, и в случае, если процесс прошел неполно, образец размораживают и протеолиз продолжают. На конечной стадии нерастворимые пептиды отделяют центрифугированием и обе части гидролизата лиофилизуют. Целесообразно нерастворимые пептиды подвергнуть повторному гидролизу с большей нагрузкой фермента и присоединить образовавшиеся пептиды к основной массе (см. также гл. 3).

10.4. Фракционирование растворимых пептидов

Выбор оптимальной схемы фракционирования смеси пептидов основан на предварительной информации об их общем числе, размерах, величине зарядов и растворимости. Как правило, крупные фрагменты менее растворимы, чем короткие, а размер пептидов, как и заряд, определяются природой использованной для гидролиза протеазы. Например, триптические пептиды обычно бывают кислыми, а не основными, поскольку вероятность содержания в них по крайней мере двух кислых аминокислот больше, чем внутренних остатков лизина и аргинина или двух гистидинов. В планировании схемы фракционирования, однако, гораздо более полезным, чем свод общих правил, оказывается проведение аналитического картирования на бумаге исследуемой смеси с окрашиванием пептидов нингидрином и селективными реагентами. Получение обычной пептидной карты включает электрофорез при pH 6,5 в одном направлении и хроматографию в системе бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин (БУВП) в перпендикулярном направлении (табл. 10.4). Поскольку при гидролизе возможно образование значительного числа нейтральных пептидов, полосу при pH 6,5 вырезают и подвергают электрофорезу при pH 2,1. Если по результатам картирования в смеси преобладают крупные кислые пептиды, то на первой стадии разделения целесообразно использовать такую смолу, как ДЭАЭ-целлюлоза, при наличии значительного числа нейтральных и основных пептидов рекомендуется применять дауэкс-50. Хорошая пептидная карта на этой стадии очень полезна и для оценки общего числа компонентов в гидролизате, позволяющей контролировать возможные потери пептидов при дальнейшей очистке.

Таблица 10.4. Условия высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге. Нагрузка смеси пептидов <50 нмоль/см каждого пептида для ватмана № 1 или 200 нмоль/см для ватмана 3 ММ

Метод	Состав буфера, мл					Охлаждающий агент	Положение линии старта, см	Время, мин	Напряжение, кВ
	бутанол	уксусная кислота	муравьиная кислота	пиридин	вода				
Электрофорез при различных pH									
6,5	—	0,3	—	10	89,7	Толуол	30, от анода	45	3
3,5	—	5	—	0,5	94,5	Уайтспирит	20, от анода	90	3
2,1	—	4	—	—	45	»	10, от анода	45	3
Хроматография в системе БУВП	15	3	—	10	12	—	10, сверху	В течение ночи	

Схема разделения и очистки пептидов, описываемая ниже (включающая гельфильтрацию, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе или дауэксе-50, высоковольтный электрофорез и хроматографию на бумаге), применима к белкам средней молекулярной массы (до 40 000). Крупные фрагменты, плохо разделяющиеся на бумаге и элюирующиеся с нее, первоначально отделяют гель-фильтрацией, а основную часть пептидов после фракционирования на ионообменнике очищают окончательно хроматографией на бумаге. Однако эта схема применима далеко не ко всем типам гидролизатов белков. Например, мембранные белки плохо расщепляются ферментами с высокой специфичностью, такими, как трипсин или стафилококковая протеаза; гидрофобные пептиды склонны к образованию агрегатов при гель-фильтрации, осаждаются на ионообменных колонках и экстрагируются в охлаждающую среду при высоковольтном электрофорезе на бумаге и в органическую фазу при промывках в реакции Эдмана. Оптимальная схема анализа структуры мембранных белков включает их фрагментацию с помощью химических методов на небольшое число крупных пептидов, разделение в денатурирующих условиях на полиакриламидных гелях и определение аминокислотной последовательности автоматическим методом после присоединения пептида к твердой матрице. Альтернативный вариант основан на использовании протеаз с низкой специфичностью (таких, как пепсин или эластаза). При этом образуется значительное число коротких пептидов, которые

затем разделяют на дауэксе-50, структура пептидов, содержащихся в негомогенных фракциях, может быть установлена с помощью масс-спектрометрического анализа [44]. В последние годы широкое применение для быстрого разделения пептидов нашел метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (гл. 6).

10.4.1. Гель-фильтрация

Метод гель-фильтрации широко используют на первой стадии разделения, поскольку при этом обычно достигаются высокие выходы, а крупные пептиды часто получаются в состоянии, не требующем дальнейшей очистки. Растворимые пептиды наносят на колонки с сефадексом G-50 или G-25 в аммонийбикарбонатном буфере и элюируют этим же буфером, контролируя процесс фракционирования спектрофотометрически при 280 нм (максимум поглощения остатков триптофана и тирозина) и 230 нм (максимум поглощения пептидной связи). Для полного растворения исходной смеси в небольшом объеме (для нанесения на колонку) иногда следует добавить небольшое количество кристаллической мочевины. Пептиды, полученные при гидролизе пепсином, плохо растворяются при нейтральном pH, их солюбилизируют в небольшом объеме 100%-ной муравьиной кислоты, разбавляют до 5%-ной концентрации и наносят на колонки с сефадексом или биогелем, уравновешенные тем же раствором.

Небольшие порции каждой из полученных фракций анализируют методом высоковольтного электрофореза на бумаге, у «условно чистых» пептидов определяют N-концевую аминокислоту и иногда частичную аминокислотную последовательность по методу Эдмана в дансильном варианте (гл. 11). Из фракций, содержащих гомогенные по всем показателям пептиды, отбирают аликвоты на аминокислотный анализ, после чего их лиофилизуют. Крупные пептиды (20—50 остатков), даже чистые, часто проявляются на электрофореграммах в виде диффузных полос в отличие от небольших фрагментов, получающихся при их гидролизе, образующих четкие зоны при электрофорезе. Это позволяет при повторной фрагментации небольшой порции материала из «условно чистых» пиков хроматограммы обнаружить с помощью электрофореза наличие в них минорных компонент, не регистрируемых другим путем. Крупные пептиды, загрязненные примесями, могут быть успешно очищены на ДЭАЭ-целлюлозе, хотя выходы при этом бывают довольно низкими. Поскольку для установления или контроля аминокислотной последовательности крупного пептида, как правило, необходимо проведение дополнительного гидролиза, целесообразно две трети очищенного материала оставить для этих целей. Даже

Таблица 10.5. Ионообменные колонки

Общие указания	Дауэкс-50	ДЭАЭ-целлюлоза
Приготовление смолы	Промывают in situ 1 М NaOH, 1 М HCl и буфером с pH 5,0 (2 М пиридин: 645 мл пиридина+573 мл ледяной уксусной кислоты+вода до общего объема 4 л). После проверки на отсутствие Na^+ в элюенте (по окрашиванию пламени) промывают буфером pH 3,1 (0,2 М пиридин: 64,5 мл пиридина+1114 мл ледяной уксусной кислоты+вода до общего объема 4 л) до уравновешивания колонки	Обрабатывают на воронке Бюхнера по прописи изготовителя (промывают 0,2 М NaOH, дистиллированной водой, 0,2 М HCl и снова дистиллированной водой). Оставляют на несколько часов в 10%-ном бикарбонате аммония. Промывают 0,1%-ным бикарбонатом аммония (pH 8,3) и заполняют колонку. Уравновешивают ионообменник в течение ночи прокачиванием того же буфера со скоростью 100 мл/ч
Тип колонки и размеры	Колонка высокого давления с водяной рубашкой (9,0×Х500 мм)	Стеклянная пипетка (объем 25 мл) с прокладкой из стеклянной ваты снизу и резиновой пробкой сверху, через которую проходит игла шприца
Температура колонки	60 °С	Комнатная
Скорость потока	15 мл/ч (насос высокого давления, например хроматографический мини-насос фирмы Milton Roy)	5 мл/ч
Объем фракции, мл	2	2
Нанесение образца	Образец растворяют в 1 мл воды с добавлением нескольких капель конц. HCl до pH 2. Отделяют центрифугированием осадок (при помутнении), наносят на колонку продувают азотом и заполняют свободный объем буфером pH 3,1	Обессоленный образец растворяют в 2 мл 0,1%-ного бикарбоната аммония (pH 8,3). При необходимости добавляют кристаллическую мочевину для растворения осадка
Промывка 1	Промывают буфером pH 3,1 до полного элюирования кислых пептидов (один объем колонки). Контроль: высоковольтный электрофорез на бумаге при pH 6,5	Промывают 0,1%-ным бикарбонатом аммония (pH 8,3) до полного элюирования основных пептидов. Контроль по измерению оптической плотности при 230 нм

Продолжение табл 10.5

Общие указания	Дауэкс-50	ДЭАЭ-целлюлоза
Градиент pH буферных растворов	300 мл буфера pH 3,1+600 мл буфера pH 5,0 (т. е. в соотношении 1 : 2, в градиентном смесителе) обеспечивают линейный градиент по концентрации ионов пиридина	Первый градиент: 200 мл 0,1-ного бикарбоната аммония (pH 8,3)+200 мл 1%-ного бикарбоната аммония (pH 8,3); элюируются основные и нейтральные пептиды. Второй градиент: 200 мл 1%-ного бикарбоната аммония (pH 8,3)+ +200 мл 3%-ного бикарбоната аммония (pH 8,3); элюируются преимущественно кислые пептиды
Промывка 2	Буфер pH 5,6 (8,5 М пиридин: 684 мл пиридина+180 мл ледяной уксусной кислоты+вода до общего объема 1 л)	50 мл 5%-ного бикарбоната аммония, затем 10 мл 6 М гуанидингидрохлорида. По окончании процесса колонка должна быть приведена к исходным условиям

при низком выходе пептида с ДЭАЭ-целлюлозы его количества обычно бывает достаточно для аминокислотного анализа, определения частичной аминокислотной последовательности и проведения дополнительного гидролиза на аналитическом уровне. Полученный гидролизат анализируют методом электрофореза и хроматографии, затем проводят препаративный гидролиз на неочищенном пептиде и фрагменты, принадлежащие главному компоненту, идентифицируют путем сопоставления с аналитической картой.

Остальные пептиды объединяют и наносят на колонку с дауэксом-50 или несколькими порциями — на ДЭАЭ-целлюлозу.

10.4.2. Хроматография на колонке с дауэксом-50

Элюирование пептидов с колонки, заполненной смолой дауэкс-50 (сульфополистирол), осуществляется с помощью повышающегося градиента pH и концентрации пиридина [58, 60] (детали приведены в табл. 10.5). При pH 2 карбоксильные группы С-концевых остатков и боковых цепей аспарагиновой и глутаминовой кислот протонированы, как и N-концевые аминогруппы и боковые цепи аргинина, лизина, гистидина. В этих условиях пептиды сорбируются на сульфогруппах смолы. При повышении pH карбоксильные группы ионизируются и пептиды отделяются от смолы. Таким образом, фракционирование пептидов

происходит в соответствии с их суммарным зарядом и рК карбоксильных групп. Первыми элюируются кислые пептиды, затем нейтральные и основные. Нейтральные пептиды сходят с колонки обычно двумя группами: сначала «истинно» нейтральные, не содержащие внутренних оснóвных или кислотных остатков, а затем пептиды, внутренние заряды которых компенсированы. Это деление обусловливается более высоким значением р*K* карбоксильных групп боковых цепей по сравнению с карбоксильными группами С-концевых остатков. Крупные, гидрофобные и очень оснóвные пептиды (с положительными зарядами от нескольких групп) обычно элюируются с низким выходом. Поскольку пиридин «непрозрачен» в ультрафиолете при 230 и 280 нм, кривые элюирования пептидов строятся по данным анализа небольших порций полученных фракций методом высоковольтного электрофореза на бумаге при pH 6,5; по результатам анализа фракции объединяют и концентрируют на роторном испарителе.

10.4.3. Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой

Элюирование пептидов с ДЭАЭ-целлюлозы (диэтиламиноэтилцеллюлозы) проводят в повышающемся градиенте концентрации иона бикарбоната [55] (табл. 10.5). При pH 8,0 С-концевые карбоксильные группы и карбоксильные группы боковых цепей аспарагиновой и глутаминовой кислот ионизированы, в то время как боковые группы аргинина и лизина протонированы. Имидазольное кольцо гистидина полностью депротонировано, а его N-концевая аминогруппа депротонирована на 50%. Пептиды разделяются в соответствии с их суммарным зарядом при pH 8,0.

Первыми элюируются оснóвные пептиды, затем нейтральные и кислые; при нанесении образца в растворе низкой ионной силы и последующем элюировании таким же раствором может быть достигнуто хорошее разделение основных пептидов. Такого рода «гидрофобные» взаимодействия с матрицей позволяют разделять структурно близкие пептиды, различающиеся только нейтральными аминокислотами.

Контролируют разделение пептидов по поглощению элюата при 280 и 230 нм и с помощью метода аналитического электрофореза на бумаге. В соответствии с полученными данными фракции объединяют и высушивают на роторном испарителе.

10.4.4. Высоковольтный электрофорез и хроматография на бумаге

Электрофорез и хроматография на бумаге удобны как быстрые методы очистки средних и коротких пептидов (разд. 10.8.2). Электрофорез обычно проводят при pH 6,5, 3,5 и 2,1. При этих

pH боковые цепи остатков лизина и аргинина, как и N-концевые аминогруппы, полностью протонированы. При pH 6,5 имидазольное кольцо гистидина частично протонировано, а карбоксильные группы полностью ионизированы. При pH 3,5 гистидин полностью протонирован, а карбоксильные группы протонированы частично. При pH 2,1 карбоксильные группы протонированы полностью, исключение составляет сульфогруппа боковой цепи цистеиновой кислоты. Подвижность пептидов в электрофорезе строго зависит от их суммарного заряда и размера [46], их локализация на бумаге определяется окрашиванием боковой полоски листа нингидрином (в случае одномерных карт) или опрыскиванием раствором флуорескамина низкой концентрации (для одномерных и двумерных карт). Процесс электрофоретического разделения на бумаге очень чувствителен к наличию солей в образце и перегрузке носителя, а детекция пептидов с помощью указанных реактивов возможна лишь при наличии неблокированной N-концевой аминогруппы. Разделение пептидов при хроматографии на бумаге в системе БУВП [77] (табл. 10.4) происходит в соответствии с их коэффициентом распределения между водной и органической фазами: гидрофобные пептиды движутся быстрее, чем гидрофильные. Разрешающая способность хроматографии в БУВП ниже, чем электрофореза, однако для разделения пептидов одинакового размера и заряда ценность метода несомненна.

10.5. Фракционирование нерастворимых пептидов

Нерастворимые (кóровые) пептиды могут быть солюбилизированы и затем разделены в денатурирующих условиях, но, как правило, более выгодно проводить их предварительную фрагментацию. Для гидролиза смеси труднорастворимых алифатических пептидов используют эластазу или термолизин, для пептидов ароматического характера — химотрипсин или пепсин при кислых pH. Образовавшиеся фрагменты разделяют хроматографией на бумаге или, если кор составляет значительную часть молекулы белка, на колонке дауэкс-50 с окончательной очисткой полученных фракций на бумаге.

10.6. Контроль гомогенности и определение аминокислотной последовательности пептидов

Степень чистоты выделенных пептидов определяют с помощью электрофореза при двух pH — 2,1 и 6,5, а также аминокислотного анализа и определения N-концевого остатка. Характеристики электрофоретической подвижности пептида при pH 2,1 и 6,5 [46] в совокупности с данными аминокислотного состава

позволяют оценить размер пептида и число содержащихся в нем амидных групп. Прежде чем начинать определение аминокислотной последовательности, целесообразно создать некоторый «фонд» чистых пептидов, поскольку одновременно параллельно можно анализировать до 20 образцов (подробно методики определения структуры в дансильном и ДАБИТЦ — ФИТЦ-вариантах приведены в гл. 11 и 14). Идентификация амидов дикарбоновых аминокислот в дансильной методике может быть осуществлена по электрофоретической подвижности небольшой порции исследуемого пептида до и после отщепления по Эдману остатков Asx и Glx. Альтернативный вариант заключается в определении электрофоретических характеристик (pH 6,5) коротких фрагментов исходного пептида, полученных при его ферментативном гидролизе (после установления структуры дансильным методом). Выбор фермента диктуется необходимостью идентификации конкретного остатка дикарбоновой аминокислоты в цепи, особенно удобно использовать для этой цели стафилококковую протеазу.

Поскольку надежность определения аминокислотной последовательности снижается при приближении к С-концу пептида, рекомендуется выделить С-концевой(ые) фрагмент(ы) исходного соединения, проверив еще раз его аминокислотный состав, подвижность в электрофорезе при pH 6,5 и полученные характеристики сравнить с ожидаемыми на основании имеющихся структурных данных. Погрешности в установлении С-концевой аминокислотной последовательности могут привести к неправильному соединению фрагментов и, таким образом, к значительным ошибкам при реконструкции полипептидной цепи. Разумно совместить в одном эксперименте контроль структуры С-концевой области пептида с идентификацией амидов дикарбоновых аминокислот.

Причины возможных ошибок в определении аминокислотной последовательности многообразны. Так, гистидин менее устойчив в условиях реакции, чем другие аминокислоты, и преждевременное расщепление связей по остатку гистидина может привести к его потере (пропуску) в полипептидной цепи или, что более обычно, к появлению гетерогенности в последовательности [59, 61]. Неполное отщепление аминокислоты при обработке безводной кислотой, неудовлетворительная экстракция тиазолинона или его частичная деструкция могут быть причинами ошибочной идентификации на данной стадии аминокислотного остатка, являющегося «остаточным» от предшествующего. Вероятность ошибки возрастает в тех случаях, когда N-концевыми становятся остатки пролина или триптофана, дансильные производные которых разрушаются в процессе гидролиза. Усложняет процесс идентификации возможная экстракция

в органическую фазу укороченных, особенно неполярных, пептидов.

В результате неполного расщепления некоторых связей при кислотном гидролизе дансилпептида (преимущественно с N-концевыми остатками Ile и Val) образуются дансильные производные дипептидов, которые могут быть ошибочно идентифицированы как дансиламинокислоты, поскольку положения их пятен при хроматографии на полиамидных пластинках совпадают, например дансил-Ile-Glu и дансил-Glu. Наконец, источником ошибок может быть «перекрестная» идентификация аминокислот при определении структуры негомогенного пептида. При небольшом содержании примесного пептида удается определить последовательность главного компонента смеси, но возможное блокирование основного пептида (по остаткам Gln, Trp или связи Asn-Gly) или его предпочтительная экстракция в растворитель при промывках могут привести к тому, что минорная последовательность с определенного положения цепи будет принята за основную.

10.7. Реконструкция полипептидной цепи

Для установления общей последовательности белка пептиды одного типа гидролиза должны быть «перекрыты» пептидами, полученными из другого гидролизата. Некоторые комбинации протеолитических фрагментов, такие, как трипсин и химотрипсин или трипсин и стафилококковая протеаза, хорошо дополняют друг друга в этом отношении, в то время как комбинация трипсин+протеаза из *A. mellea* или химиотрипсин+пепсин менее выгодны, поскольку они образуют значительное число фрагментов, отличающихся только на один аминокислотный остаток (табл. 10.1). Нет необходимости определять полную структуру всех пептидов второго набора, обычно ограничиваются получением таких характеристик, как аминокислотный состав, N-концевые аминокислоты, электрофоретическая подвижность, но, безусловно, должна быть установлена аминокислотная последовательность «перекрывающих» областей и тех участков цепи, корректность структуры которых вызывает сомнение. Перекрывающая последовательность должна захватывать по крайней мере два С-концевых остатка одного пептида и два N-концевых другого. Если установление структуры белка не завершено в значительной степени, то более короткие перекрывающие последовательности, чем указанные, должны быть подтверждены дополнительными данными. Если же структура установлена почти полностью, то вероятность конкурирующей последовательности для «неубедительного» перекрытия снижается и пептиды могут быть ориентировочно размещены по цепи. Стратегия

и выбора рациональной схемы фракционирования пептидов. Например, по данным аминокислотного анализа белок содержит 15 остатков аргинина, однако при фракционировании триптического гидролизата на двумерной карте после обработки фенантренхиноном [80] обнаружено только 5 флуоресцентных пятен. Это свидетельствует или о том, что в нерастворимом коре остались нерасщепленными 10 остатков аргинина, или о том, что при гидролизе образовалось 10 крупных нерастворимых пептидов которые задержались на старте. Одна пептидная карта может быть последовательно окрашена флуорескамином [7, 74] фенантренхиноном (остатки аргинина) [80] и, наконец, реагентом Паули (остатки гистидина и тирозина) [17]. Если белок предварительно окислен надмуравьиной кислотой, то триптофансодержащие пептиды обнаруживаются по флуоресценции при осмотре хроматограммы под ультрафиолетовой лампой до опрыскивания флуорескамином (разд. 8.14).

Оптимальные условия для разделения растворимых пептидов конкретного белка могут быть определены только экспериментально. Однако чаще всего и успешно используется следующая последовательность операций: электрофорез при pH 6,5, а затем хроматография в БУВП с последующим разделением полосы нейтральных пептидов при pH 2,1 или 3,5 [7]. Гидролизуют 10—20 нмоль белка, лиофилизуют для удаления солей. Растворяют в небольшом объеме 98%-ной муравьиной кислоты, разбавляют до 50%-ной концентрации и наносят в виде полосы шириной 1 см на бумагу ватман 3 ММ для электрофореза при pH 6,5 (табл. 10.4). Полосу нейтральных пептидов вырезают и подшивают к старту листа бумаги ватман 3 ММ для хроматографии в системе БУВП. Подобным же образом поступают с полосами кислых и основных пептидов. После хроматографии вновь вырезают нейтральную полосу и подшивают ее к листу бумаги ватман 3 ММ для заключительного электрофореза при pH 2,1 или 3,5.

Аналитические пептидные карты служат также для контроля процесса элюирования пептидов с колонки и последующего объединения фракций. Для этого небольшие порции (5 нмоль пептида) чередующихся фракций высушивают досуха, вновь растворяют в 50 мкл электрофоретического буфера (pH 6,5), наносят в виде прилегающих друг к другу полосок (1 см) на лист бумаги ватман № 1. После электрофореза полосу нейтральных пептидов вырезают, пришивают к другому листу бумаги и проводят электрофорез при pH 2,1. Кислые, основные и нейтральные пептиды окрашивают на картах флуорескамином, фенантренхиноном и реактивом Паули.

10.8.2. Препаративные электрофорез и хроматография на бумаге

Разделение относительно простой смеси пептидов, такой, например, как объединенная фракция кислых пептидов с ДЭАЭ-целлюлозы, может быть осуществлено однократной хроматографией на бумаге. Для фракционирования более сложных смесей («хвостовые» фракции с колонки с сефадексом G-50) может потребоваться применение нескольких методов, последовательность которых лучше всего выбирать после проведения аналитического электрофореза при pH 6,5 с последующим фракционированием нейтральной полосы при pH 2,1. Сложная смесь нейтральных пептидов, как правило, лучше разделяется в условиях хроматографии в системе БУВП, тем не менее часто предпочитают электрофорез из-за большей компактности образующихся полос. Кроме того, примеси, элюирующиеся с бумаги после хроматографии в БУВП, могут катализировать деструкцию остатков тирозина во время кислотного гидролиза пептида (во избежание которой добавляют 0,1% фенола к 6 М HCl) и препятствовать полноте протекания реакции дансилирования (для удаления примесей пептиды экстрагируются бутилацетатом). Эти осложнения можно устранить, применяя хроматографию на первой стадии разделения. Заключительную стадию очистки пептида реко-

Таблица 10.6. Маркеры для электрофореза

Маркеры	Способ приготовления
Ксилолцианол FF и оранжевый G (красители)	Растворяют 500 мг красителя в 10 мл воды
Дансил-Arg-Arg, дансил-Arg и дансиловая кислота (флуорохромы)	Растворяют 17,4 мг аргинина и 47,4 мг аргиниларгинина в 10 мл 0,5 М $NaHCO_3$; добавляют 80 мг дансилхлорида в 10 мл ацетона и инкубируют в запаянной пробирке 2 ч при 37 °С; хранят при 4 °С
Смесь аминокислот	Готовят смесь следующих аминокислот (по 1 мг): Cya, Leu, Phe, Pro, Tyr, Val, Arg, Lys; 2) Asp, Glu, Ala, Gly, Ile, Ser, Thr, His; каждый набор аминокислот доводят до 1 мл раствором 1 мМ HCl; раствор хранят при 4 °С

мендуется проводить на бумаге ватман № 1, поскольку уровень свободных аминокислот на ней ниже, чем на бумаге ватман 3 ММ.

Пептиды растворяют в буфере pH 6,5 (табл. 10.4) и наносят вдоль линии старта (полосой). Нерастворимые пептиды после высушивания растворяют в небольшом объеме 98%-ной муравьиной или уксусной кислоты, затем разбавляют водой до 50%-ной концентрации и наносят на бумагу. В процессе нанесения раствор высушивают теплым воздухом (с помощью фена), при этом надо соблюдать осторожность, поскольку при перегревании возможно окисление остатков метионина, приводящее к образованию нескольких форм одного пептида (с разными значениями R_f при хроматографии). При электрофорезе между образцами пептидов наносят флуоресцентные маркеры (табл. 10.6), а в углы листа бумаги — красители. Полезно использовать в качестве «свидетелей» смесь аминокислот, особенно если для проявления электрофореграммы используется окрашивание нингидрином. В хроматографии маркером служит положение фронта растворителя.

10.8.2.1. Одномерное разделение. Смесь нескольких пептидов (каждого <1 мкмоль) растворяют в 0,5 мл буфера (pH 6,5) и наносят в виде полосы 15 см на лист бумаги ватман № 1. Опрыскивают электрофореграмму флуорескамином и окрашивают боковую полосу нингидрином.

10.8.2.2. Двумерное разделение. Смесь пептидов (каждого <1 мкмоль) растворяют в 1 мл буфера (pH 6,5) и наносят в виде полосы в 15 см на бумагу ватман 3 ММ. Проведя электрофорез или хроматографию в первом направлении, опрыскивают флуорескамином, боковую полосу бумаги окрашивают нингидрином и фенантренхиноном. Вырезают пептидные и промежуточные полосы и «пришивают» их к бумаге ватман № 1. Промежуточные полосы также анализируют, поскольку они могут содержать уникальные пептиды, образовавшиеся с низким выходом, которые замаскированы другими пептидами в основной полосе.

Проводят электрофорез во втором направлении и проявляют электрофореграмму. Если в первом направлении использовалась хроматография, то перед электрофорезом во втором направлении широкие пептидные полосы можно сконцентрировать осторожным смачиванием листа бумаги.

Если в смеси находится <500 нмоль каждого пептида, то ее растворяют в 0,5 мл буфера (pH 6.5) и наносят на бумагу ватман 3 ММ полосой в 5 см. Дальнейшие процедуры аналогичны вышеописанным.

10.8.2.3. Двумерное разделение, дополненное трехмерным разделением нейтральных пептидов. Смесь пептидов (каждого <500 нмоль) растворяют в 0,5 мл буфера (pH 6,5), наносят полосой в 5 см на бумагу ватман 3 ММ. После электрофореза при pH 6,5 вырезают полосу нейтральных пептидов, «подшивают» ее к листу бумаги ватман 3 ММ и хроматографируют в системе БУВП. Вновь вырезают с хроматограммы нейтральную полосу, «пришивают» ее к листу бумаги ватман № 1 и проводят заключительный электрофорез. Полосы кислых и основных пептидов «подшивают» к бумаге ватман № 1 для электрофореза во втором направлении.

10.8.3. Окрашивание пептидов

Высушенный после электрофореза или хроматографии лист бумаги исследуют в ультрафиолетовом свете для локализации флуоресцентных пятен (окисленные остатки триптофана). Пептиды затем проявляют обработкой флуорескамином [74] и/или реагентом нингидрин — ацетат кадмия [28].

Окрашивание флуорескамином делает возможным последующее препаративное элюирование пептидов с двумерных карт на бумаге и позволяет контролировать правильность вырезания полос после одномерного разделения (обычно хроматографией в БУВП). Проявление нингидрином (боковой полосы) уступает по чувствительности флуорескамину и иногда не обнаруживает пептидов с N-концевыми остатками Ile и Val, но оно более достоверно, поскольку интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству пептида. В отличие от флуорескамина нингидрин окрашивает пептиды с N-концевыми остатками пролина. С помощью этого реагента можно до известной степени даже дифференцировать N-концевые аминокислотные остатки по образующемуся цвету пятна: красному для большинства аминокислот, желтому для Gly и Ser и оранжевому, переходящему постепенно в красный, для Asn и Cya. Совместное применение флуорескамина, нингидрина и цветных реакций на определенные аминокислоты помогает точно локализовать пептид в сложных смесях при одномерном разделении.

10.8.3.1. Окрашивание флуорескамином. Флуорескамин хранят в виде раствора в безводном ацетоне с концентрацией 0,1 мг/мл. Перед употреблением 1 мл этого раствора добавляют к 100 мл 1%-ного (об./об.) пиридина в ацетоне. Бумагу погружают в раствор и затем высушивают в потоке теплого (или комнатной температуры) воздуха. Если после осмотра хроматограммы под ультрафиолетовой лампой не появились флуоресцирующие пятна, процедуру повторяют, увеличив концентрацию флуорескамина (2 мл исходного раствора на 100 мл пиридина).

10.2.3.2. Окрашивание реагентом нингидрин — ацетат кадмия. Нингидрин хранят в виде 0,25%-ного (масс./об) раствора в ацетоне, а ацетат кадмия — в водной уксусной кислоте (1 г $Cd(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ — 50 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл воды). Бумагу погружают в смесь, приготовленную из 100 мл раствора нингидрина и 15 мл раствора ацетата кадмия, сушат при комнатной температуре и затем нагревают при 100 °C в течение 3 мин. После проявления окраски оставляют хроматограмму на ночь под тягой для развития окраски и проявления медленно реагирующих пептидов.

10.8.4. Элюирование пептидов

Каждую из вырезанных полос обрезают с одной стороны для придания остроконечной формы. Прямоугольный конец бумаги опускают в камеру, заполненную элюирующим буфером (прижимают полосу покровным стек-

лом от микроскопа). Заостренный конец полосы подводят к пробирке, всю систему покрывают колпаком для насыщения атмосферы буферным раствором. Движение буфера вниз по полосе происходит за счет капиллярных сил. Для элюирования основных пептидов используют 25—50%-ную уксусную кислоту, все остальные пептиды элюируют 10—20%-ным пиридином; с каждой полосы собирают ~200 мкл раствора. Высушивают фракции в вакууме масляного насоса над NaOH (для уксусной кислоты) или P_2O_5 (для водного пиридина). Процесс проходит очень быстро, если пробирку поместить в нагреваемый (40 °C) металлический блок.

Литература

1. *Adelstein R. S., Kuehl W. M.*, Biochemistry, **9**, 1355—1364 (1970).
2. *Ambler R. P.*, Biochem. J., **96**, 32P (1965).
3. *Artavanis S.*, TIM from *B. stearothermophilus*. Ph. D. Thesis, University of Cambridge, 1974.
4. *Blombäck B.*, Methods Enzymol., **11**, 398—411 (1967).
5. *Bornstein P.*, Biochemistry, **9**, 2408—2421 (1970).
6. *Bornstein P., Balian G.*, J. Biol. Chem., **245**, 4854—4856 (1970).
7. *Bruton C. J.*, Biochem. J., **147**, 191—192 (1975).
8. *Butler P. J. G., Hartley B. S.*, Methods Enzymol., **25**, 191—199 (1972).
9. *Chang J. Y., Brauer D., Wittmann-Liebold B.*, FEBS Lett., **93**, 205—214 (1978).
10. *Corradin G., Harbury H. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **221**, 489—496 (1970).
11. *Degani Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **13**, 1—11 (1974).
12. *Doolittle R. F.*, Methods Enzymol., **25**, 231—244 (1972).
13. *Doonan S., Doonan H. J., Hanford R., Vernon C. A., Walker J. M., Airoldi L. P. da S., Bossa F., Barra D., Carloni M., Fasella P., Riva F.*, Biochem. J., **149**, 497—506 (1975).
14. *Doyen N., Lapresle C.*, Biochem. J., **177**, 251—254 (1979).
15. *Drapeau G. R.*, Methods Enzymol., **47**, 189—191 (1977).
16. *Drapeau G. R., Boily Y., Houmard J.*, J. Biol. Chem., **247**, 6720—6726 (1972).
17. *Easley C. W., Zegers B. J. M., Vijlder M. D. de*, Biochim. Biophys. Acta, **175**, 211—213 (1969).
18. *Edelman G. M., Gall W. E., Waxdal M. J., Konigsberg W. H.*, Biochemistry, **7**, 1950—1958 (1968).
19. *Edman P.*, Arch. Biochem. Biophys., **22**, 475—476 (1949).
20. *Edman P.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1970, pp. 211—255.
21. *Edman P., Begg G.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80—91 (1967).
22. *Greene L. J., Bartelt D. C.*, Methods Enzymol., **47**, 170—174 (1977).
23. *Gross E.*, Methods Enzymol., **11**, 238—255 (1967).
24. *Harris J. I.*, Nature (Lond.), **177**, 471—473 (1956).
25. *Hartley B. S.*, In: Structure and Activity of Enzymes, Goodwin T. W., Harris J. I., Hartley B. S. (Eds.), Academic Press, New York, 1964, p. 47.
26. *Hartley B. S.*, Biochem. J., **119**, 805—822 (1970).
27. *Hartley B. S., Shotton D. M.*, In: The Enzymes, Boyer P. D. (Ed.), 3rd edn., vol. 3, Academic Press, New York, 1971, p. 323.
28. *Heilmann J., Barrollier J., Watzke E.*, Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem., **309**, 219—220 (1957).
29. *Heinrikson R. L.*, Methods Enzymol., **47**, 175—189 (1977).
30. *Hirs C. H. W.*, Methods Enzymol., **11**, 197—199 (1967).
31. *Hirs C. H. W.*, Methods Enzymol., **11**, 199—203 (1967).
32. *Houmard J., Drapeau G. R.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 3506—3509 (1972).
33. *Ilse D., Edman P.*, Aust. J. Chem., **16**, 411—416 (1963).
34. *Jörnvall H.*, Eur. J. Biochem., **16**, 25—40 (1970).

35. *Jörnvall H.*, Abstr. Int. Cong. Biochem. 9th, Colloquium D, Abstract Db, **13**, 1973, p. 454.
36. *Karlsson F. A., Peterson P. A., Berggard I.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **64**, 1257—1263 (1969).
37. *Konigsberg W.*, Methods Enzymol., **25**, 185—188 (1972).
38. *Konigsberg W. H., Steinman H. M.*, In: The Proteins, Neurath H., Hill R. L. (Eds.), 3rd edn., vol. 3, Academic Press, New York, London, 1977, p. 54.
39. *Kopple K. D., Bächli E.*, J. Org. Chem., **24**, 2053—2055 (1959).
40. *Lowey S., Slayter H. S., Weeds A. G., Baker H.*, J. Mol. Biol., **42**, 1—29 (1969).
41. *Matsubara H.*, Methods Enzymol., **19**, 642—651 (1970).
42. *Matsubara H., Feder J.*, In: The Enzymes, Boyer P. D. (Ed.), 3rd edn., vol. 3, Academic Press, London, 1971, p. 721.
43. *Mitchell W. M.*, Methods Enzymol., **47**, 165—170 (1977).
44. *Morris H. R., Williams D. H., Ambler R. P.*, Biochem. J., **125**, 189 (1971).
45. *Mutt V., Said S. I.*, Eur. J. Biochem., **42**, 581—589 (1974).
46. *Offord R. E.*, Nature (Lond.), **211**, 591—593 (1966).
47. *Ozols J., Gerard C.*, J. Biol. Chem., **252**, 5986—5989 (1977).
48. *Patthy L., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., **250**, 565—569 (1975).
49. *Perham R. N.*, Biochem. J., **105**, 1203—1207 (1967).
50. *Piszkiewicz D., Landon, M., Smith E. L.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **40**, 1173—1178 (1970).
51. *Platt T., Files J. G., Weber K.*, J. Biol. Chem., **248**, 110—121 (1973).
52. *Porter R. R.*, Nature (Lond.), **182**, 670—671 (1958).
53. *Press E. M.*, Biochem. J., **104**, 30c—33c (1967).
54. *Price N. C.*, Biochem. J., **159**, 177—180 (1976).
55. *Roy D., Konigsberg W.*, Methods Enzymol., **25**, 221—231 (1972).
56. *Savige W. E., Fontana A.*, Methods Enzymol., **47**, 459—469 (1977).
57. *Schaffer M. H., Stark G. E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **71**, 1040—1047 (1976).
58. *Schroeder W. A.*, Methods Enzymol., **11**, 351—361 (1967).
59. *Schroeder W. A.*, Methods Enzymol., **11**, 445—461 (1967).
60. *Schroeder W. A.*, Methods Enzymol., **25**, 203—213 (1972).
61. *Schroeder W. A.*, Methods Enzymol., **25**, 298—313 (1972).
62. *Schroeder W. A., Shelton J. B., Shelton J. R.*, Arch. Biochem. Biophys., **130**, 551—556 (1964).
63. *Shechter Y., Burstein Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **14**, 4497—4503 (1975).
64. *Shechter Y., Patchornik A., Burstein Y.*, Biochemistry, **15**, 5057—5075 (1976).
65. *Shipolini R. A., Callewaert G. L., Cottrell R. C., Vernon C. A.*, Eur. J. Biochem., **48**, 465—476 (1974).
66. *Shotton D. M., Hartley B. S.*, Biochem. J., **131**, 643—675 (1973).
67. *Smyth D. G.*, Methods Enzymol., **11**, 214—231 (1967).
68. *Smyth D. S., Utsumi S.*, Nature (Lond.), **216**, 332—335 (1967).
69. *Smyth D. G., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **238**, 227—234 (1963).
70. *Stark G. R.*, Methods Enzymol., **47**, 129—132 (1977).
71. *Steinman H. M., Naik V. R., Abernethy J. L., Hill R. L.*, J. Biol. Chem., **249**, 7326—7338 (1974).
72. *Swallow D. L., Abraham E. P.*, Biochem. J., **70**, 364—373 (1958).
73. *Tang J., Hartley B. S.*, Biochem. J., **102**, 593—599 (1967).
74. *Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigele M.*, Science, **178**, 871—872 (1972).
75. *Uphaus R. A., Grossveiner L. I., Katz J. J.*, Science, **129**, 641—643 (1959).
76. *Wade M., Laursen R. A., Miller D. L.*, FEBS Lett., **53**, 37—39 (1975).
77. *Waley S. G., Watson J.*, Biochem. J., **55**, 328—337 (1953).
78. *Weeds A. G., Hartley B. S.*, J. Mol. Biol., **24**, 307—311 (1967).
79. *Weeds A. G., Hartley B. S.*, Biochem. J., **107**, 531—548 (1968).
80. *Yamada S., Itano H. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **130**, 538—540 (1966).

Глава 11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ ПО МЕТОДУ ЭДМАНА С ИДЕНТИФИКАЦИЕЙ ДАНСИЛАМИНОКИСЛОТ

Г. УИНТЕР (G. WINTER, *MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, U.K.*)

11.1. Введение

Дансилхлорид (1-диметиламино-5-нафталинсульфохлорид) реагирует с α-аминогруппой пептида (и с боковыми группами остатков цистеина, тирозина, лизина и гистидина) с образованием дансильного производного пептида (ДНС-пептида). При кислотном гидролизе модифицированного таким образом пептида его N-концевой остаток отщепляется в виде флуоресцирующей дансиламинокислоты, которая легко может быть идентифицирована хроматографией на полиамидных пластинках [5]. В условиях гидролиза полностью разрушаются дансильные производные триптофана и амидов дикарбоновых аминокислот и частично дансилпролин и дансилсерин; из производных, образующихся по боковым группам, сохраняются лишь ε-дансиллизин и О-дансилтирозин.

При определении аминокислотной последовательности по дансильной методике [6, 7] после каждого цикла отщепления по Эдману N-концевой остаток укороченного пептида анализируется с помощью дансилирования небольшой пробы образца. Эта методика выгодно отличается от собственно метода Эдмана и его ДАБИТЦ — ФИТЦ-модификации [1] отсутствием промывок фенилтиокарбамилпептидов после стадии конденсации, что исключает возможные потери пептидов (особенно неполярных) за счет растворения в органической фазе. Постепенное уменьшение количества анализируемого материала (в результате отбора на дансилирование) компенсируется более высокой чувствительностью определения флуоресцирующих производных аминокислот.

11.2. Дансилирование

Введение дансильной метки в непротонированную α-аминогруппу пептида (рис. 11.1) проводят в щелочной среде в смешанном водно-органическом растворителе (органический компонент для растворения дансилхлорида). В этих условиях конкурируют два процесса — дансилирование и гидролиз дансилхлорида —

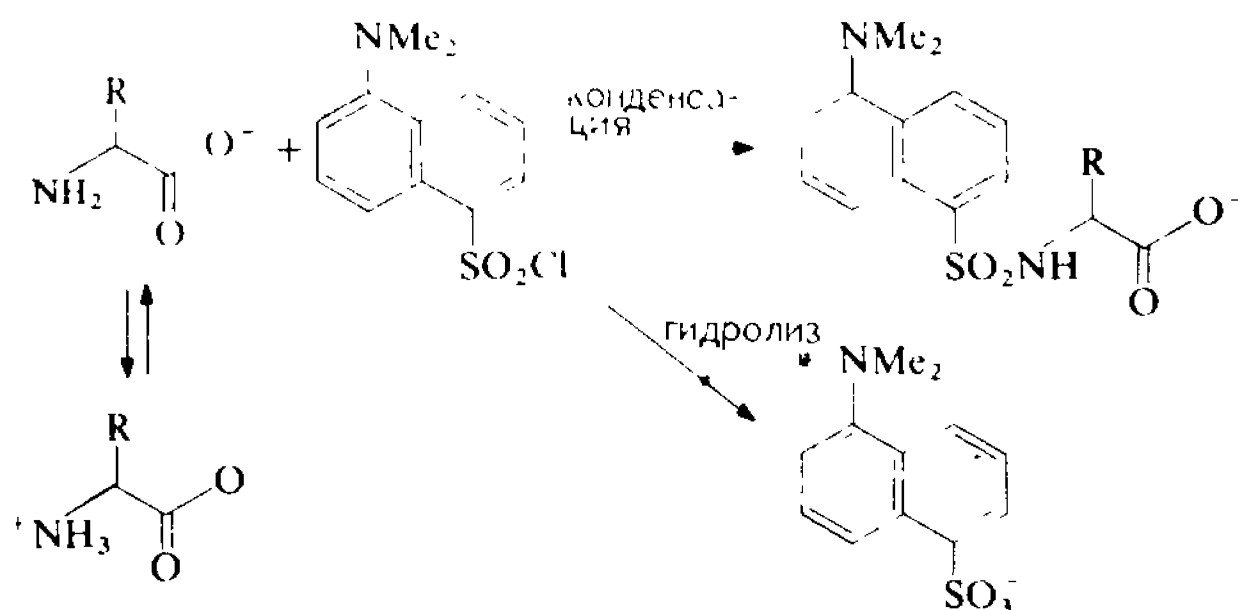


РИС. 11.1. Дансилирование аминокислоты и конкурирующий гидролиз дансилхлорида до дансиловой кислоты.

и степень модификации пептида определяется соотношением скоростей протекания этих процессов. Гидролиз дансилхлорида катализируется пиридином [4], в то время как триэтиламин ускоряет и реакцию конденсации, и гидролиз, поэтому из среды рекомендуется полностью удалять соли пиридина (образующиеся после реакции Эдмана или элюирования пептидов с бумаги) тщательным высушиванием образца в присутствии триэтиламина. Таким же образом освобождаются от следовых количеств солей аммония (привносимых с соответствующими буферами), которые реагируют с дансилхлоридом с образованием дансиламида. Использование триэтиламина сопровождается образованием еще одного дансильного производного (возможно, из-за присутствия в триэтиламине первичных и вторичных аминов), но на полиамидных пластинках пятна этих соединений мигрируют в растворителе 2 выше дансилпролина (рис. 11.2).

Модифицированные пептиды гидролизуют 6 *М* HCl при 100 °C (5—15 ч) или смесью равных объемов конц. HCl и пропионовой кислоты при 165 °C (12 мин) (*G. Winter*, неопубликованные данные). При гидролизе под действием 6 *М* HCl в течение 5 ч минимальны потери дансилпролина и дансилсерина, но не полностью расщепляются пептидные связи остатков дансилвалина и дансилизолейцина с другими аминокислотами (особенно с валином и изолейцином). Образующиеся при этом дансилдипептиды на хроматограмме могут быть ошибочно приняты за дансиламинокислоты. Положения пятен некоторых из таких производных показаны на рис. 11.2.

На хроматограмме дансилдипептиды располагаются приблизительно на линии, соединяющей положения дансильных производных, входящих в состав дипептида аминокислот. Правильность идентификации аномального пятна как дансильного производного дипептида может быть проверена с помощью более продолжительного гидролиза (>24 ч). При гидролизе смесью

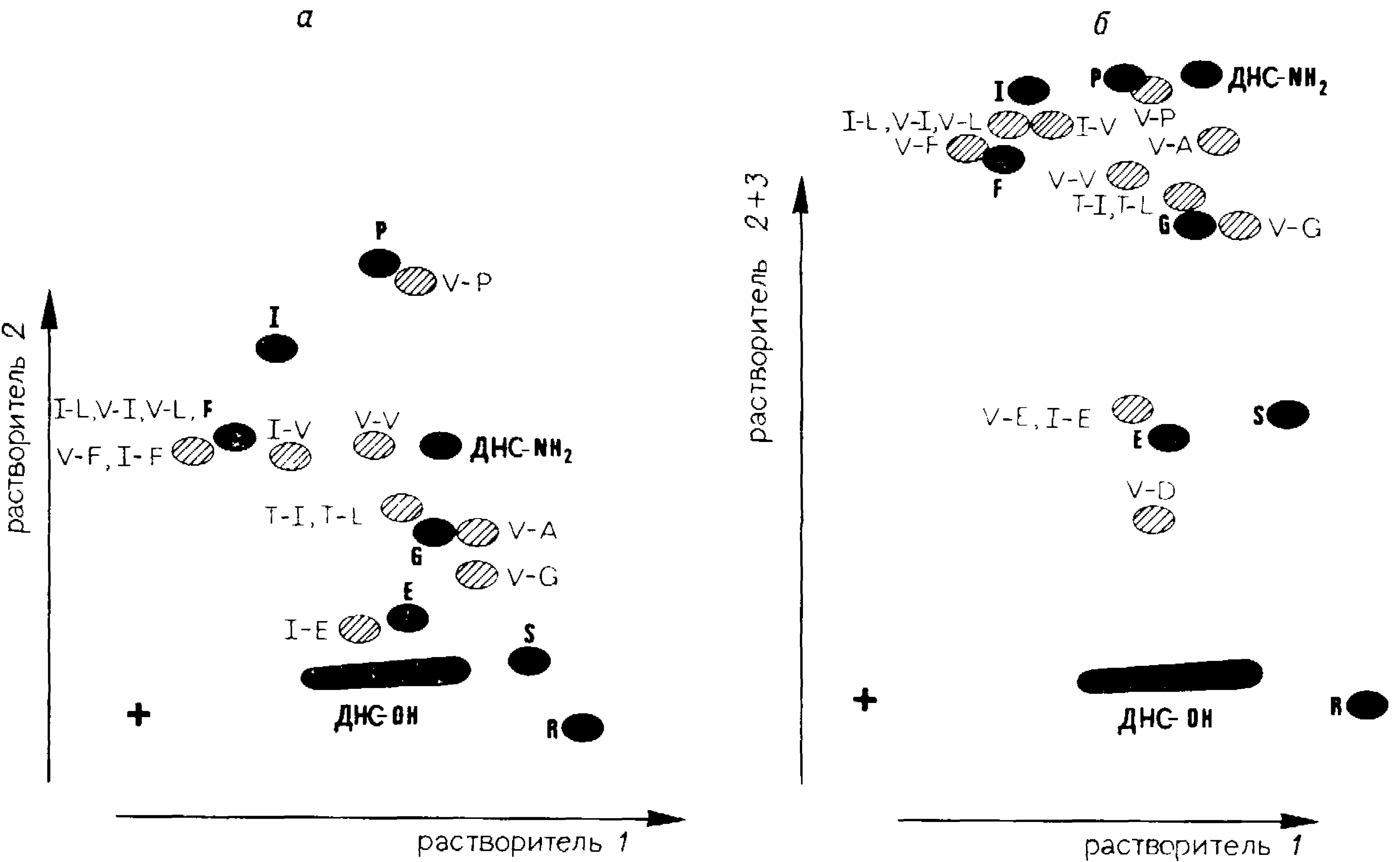


РИС. 11.2. Ориентировочное расположение пятен некоторых дансилдипептидов (заштрихованные пятна) относительно пятен ДНС-аминокислот-маркеров (темные пятна). Обозначения аминокислот даны в однобуквенном коде. *а* — после растворителей *1* и *2*; *б* — после растворителей *1*, *2* и *3*. ДНС-OH — дансиловая кислота, ДНС-NH_0 — амид дансиловой кислоты.

HCl — пропионовая кислота возрастают степень расщепления дансилпролина и дансилсерина и вероятность обнаружения на хроматограмме дансилдипептидов, однако при этом практически не происходит окисления дансилметионина, как при гидролизе в 6 *M* HCl (*G. Winter*, неопубликованные данные).

Деструкция дансилтриптофана в условиях кислотного гидролиза может быть сведена к минимуму добавлением к 6 *M* HCl 1% триптамина; дансилтриптофан может быть отщеплен также с помощью химотрипсина, однако это применимо лишь в частных случаях и требует для идентификации до 5 нмоля вещества. Различия между амидными и карбоксильными группами боковых цепей могут быть установлены электрофоретическим анализом пептида при pH 6,5 до и после отщепления по Эдману остатков Asx и Glx.

11.2.1. Методика дансилирования

1. Растворяют пептид в небольшом объеме 1%-ного водного триэтиламина (фирма Pierce, «для секвенирования»). Небольшую аликвоту (~1 мкл, 0,5 нмоль) с помощью калиброванной микропипетки (1—5 мкл) переносят на дно ампулы (при необходимости центрифугируют, чтобы жидкость стекла со стенок). Ампулы для дансилирования (4×50 мм) вытягивают из стеклянных трубок, так чтобы дно их было коническим, и перед употреблением прокаливают в течение ночи при 500—600 °C (гл. 8).

2. Высушивают образец, добавляют 3 мкл раствора бикарбоната натрия (0,2 *M*) и 3 мкл раствора дансилхлорида (5 мг в 1 мл сухого ацетона), закрывают ампулу парафильмом.

3. Инкубируют 30 мин при 50 °C; контроль по исчезновению желтой окраски дансилхлорида.

4. Высушивают на масляном насосе над гидроксидом натрия.

5. Добавляют 5 мкл 6 *M* HCl. Пептиды с ожидаемыми N-концевыми остатками карбоксиметилцистеина запаивают в вакууме, а триптофана — в присутствии 1%-ного триптамина и инкубируют при 100 °C в течение 6 ч. В альтернативном варианте добавляют 10 мкл смеси конц. HCl — пропионовая кислота (1 : 1) и выдерживают при 165 °C 12 мин.

6. Открывают ампулу (если необходимо, центрифугируют, чтобы капли раствора опустились на дно) и высушивают в вакууме масляного насоса над гидроксидом натрия.

7. Проверяют гомогенность полиамидных пластинок (75×75 мм или 50×50 мм, Cheng Chin Trading Co., Taiwan) при УФ-облучении.

8. Добавляют 3 мкл 95%-ного этанола к осадку гидролизата и с помощью капилляра наносят раствор на обе стороны пла-

стинки (максимальный диаметр пятна 1 мм). Пятна должны располагаться строго напротив друг друга на расстоянии 6 мм от двух краев. На одну сторону пластинки наносят 0,2 мкл растворов маркеров (0,1 мг/мл ДНС-Phe, ДНС-Pro, ДНС-Gly, ДНС-Glu, ДНС-Ser, ДНС-Arg).

9. Хроматографируют в двух направлениях, в каждом так, чтобы растворитель проходил 70% длины пластинки (10—30 мин): в первом направлении в системе *1* (1,5%-ная муравьиная кислота) и после высушивания в токе теплого воздуха во втором направлении (перпендикулярно первому в системе *2* (бензол — уксусная кислота, 9:1). Высушивают и исследуют обе стороны хроматограммы при УФ-облучении. В этой системе растворителей разрешаются пятна всех дансиламинокислот, за исключением пар ДНС-Glu — ДНС-Asp, ДНС-Ser — ДНС-Thr, а также α-ДНС-Lys — ε-ДНС-Lys — ДНС-Arg — ДНС-His. Пятно ДНС-Ala иногда перекрывается пятном дансиламида. Для разделения указанных дансиламинокислот используют системы растворителей *3* и *4*. Систему *3* (этилацетат — метанол — уксусная кислота, 20:1:1) применяют в том же направлении, что и растворитель *2*, для разделения ДНС-Glu — ДНС-Asp; ДНС-Ser — ДНС-Thr и улучшения разрешения ДНС-Ala и ДНС-NH_2 (рис. 11.3). Система *4* (0,05 М тринатрийфосфат — этанол, 3:1; хроматография в том же направлении, как и в системах *2* и *3*) служит для разрешения пятен монозамещенных дансильных производных основных аминокислот. Однако четкая идентификация в этом случае не всегда возможна и требуется сравнение с соответствующими маркерами, нанесенными рядом.

10. Полиамидные пластинки могут быть использованы повторно после промывки смесью аммиак — ацетон (75 мл конц. аммиака + 925 мл воды + 10 мл ацетона) в течение 1 ч. Металлические держатели для пластинок не должны оставаться в промывном растворе, поскольку возможно образование продуктов коррозии, отлагающихся на пластинках и гасящих флуоресценцию дансильных производных. Перед употреблением качество промытых пластинок надо проверять под УФ-облучением и пластинки, содержащие флуоресцирующие пятна, забраковывать.

11.3. Конденсация и расщепление по Эдману

Для успешного протекания реакции Эдмана (рис. 10.1) необходимо: использование чистых реагентов, исключение кислорода из реакционной среды, полное высушивание пептидов после стадий конденсации и расщепления. Реагенты должны быть свежеперегнанными [2], а реакционная смесь для конденсации — насыщена азотом. Образцы пептидов предварительно тщательно высушивают в нагреваемых в металлических блоках вакуумных эксикаторах.

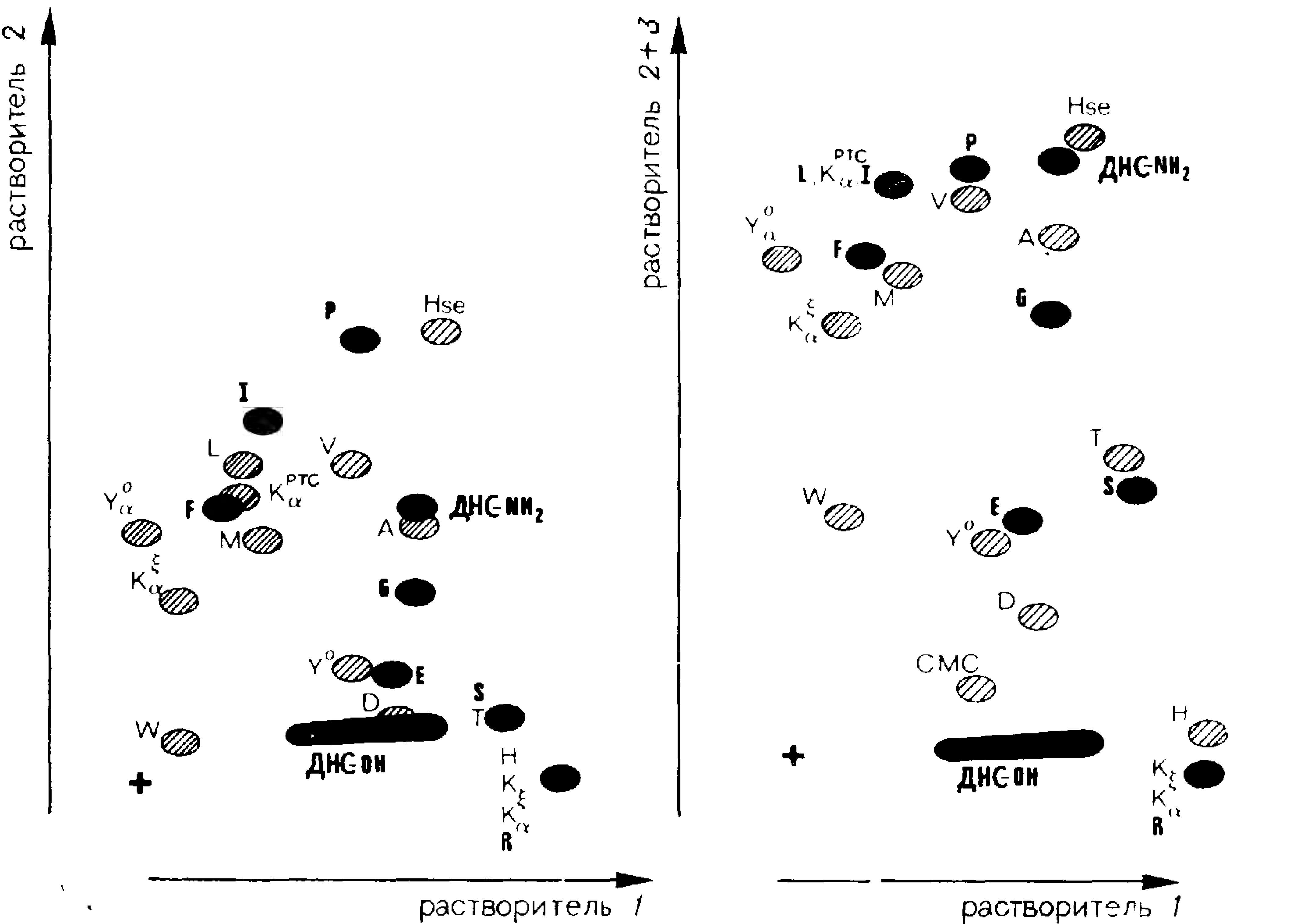


РИС. 11.3. Ориентировочное расположение пятен дансиламинокислот (заштрихованные пятна) относительно пятен маркеров (темные пятна). Hse — ДНС-гомосерин, Y^0 — ДНС-Tyr, Y_{α}^{0} — ди-ДНС-Tyr, K_{ε} — ε-ДНС-Lys, K_{α} — α-ДНС-Lys, K_{α}^{ε} — ди-ДНС-Lys, K_{α}^{PTC} — α-ДНС-ε-ФТК-Lys, CMC — ДНС-CMCys, ДНС-OH-дансиловая кислота, ДНС-NH_2 — амид дансиловой кислоты. Для других ДНС-аминокислот обозначения даны в однобуквенном коде.

Описываемая ниже методика безусловно уступает автоматическим методам как в скорости анализа (не более двух циклов расщепления в день для одного пептида), так и в выходах на стадиях, но она очень удобна для одновременного определения структуры нескольких коротких пептидов. В этом случае трудоемкий процесс насыщения азотом каждого образца в отдельности перед стадией конденсации можно усовершенствовать. Так, автор для этой цели использовал простую конструкцию — трубку с 20 ответвлениями-иглами от шприца (защищенными от коррозии тефлоновыми трубочками). Иглы расположены таким образом, что при опускании в латунный блок для нагревания входят в пробирки с образцами. Вместо завинчивающихся крышек пробирки плотно заклеивают липкой лентой, причем делают это одновременно, используя лист пленки (Perspex) с 20 лунками. Коммерчески доступно устройство, в котором осуществляется и температурный контроль за нагревом образцов в блоке (N-Evap фирмы Organomation).

Для процесса деградации по Эдману необходимы следующие реагенты (перегнанные или марки «для секвенирования») и оборудование: фенилизотиоционат (10%-ный раствор в пиридине, хранят в темноте при −20 °C не более одной недели); водный пиридин (1 : 1, хранят в темноте); трифтороуксусная кислота; этанол (95%-ный); *н*-бутилацетат, газообразный азот (в баллоне); пробирки (из пирекса), прокаленные при 500—600 °C; термостат с контролируемым нагревом, вакуум-эксикаторы и вакуумная линия к масляному насосу; эксикаторы с пентаоксидом фосфора и гидроксидом натрия (для сушки ФТК-пептидов после стадии конденсации); еще один эксикатор с гидроксидом натрия (предназначен для сушки пептидов после стадии расщепления).

11.3.1. Деградация по Эдману. Методика

1. Фенилизотиоцианат, пиридин и трифтороуксусную кислоту хранят в плотнозакрытых сосудах под азотом (насыщение азотом надо повторять до и после использования этих реактивов).

2. 20—50 нмоль пептида высушивают досуха (образец не должен содержать солей).

3. Добавляют 100 мкл 50%-ного пиридина и «продувают» азотом (1 мин).

4. Добавляют 50 мкл 10%-ного ФИТЦ в пиридине и вновь «продувают» азотом (1 мин).

5. Ампулу закрывают и инкубируют в блоке для нагревания при 50 °C (30 мин).

6. Вакуум-эксикатор с пентаоксидом фосфора и гидроксидом натрия помещают в термостат (60 °C).

7. Эксикатор вынимают из термостата и подключают к вакуумной линии для высушивания пептидов.

8. Через 10 мин проверяют, образовался ли твердый осадок (из смеси ФТК-пептида и дифенилтиомочевины) розоватого цвета, если в остатке масло, то добавляют 50 мкл 95%-ного этанола и повторяют операцию высушивания.

9. Осадок растворяют в 50 мкл безводной трифтороуксусной кислоты, закрывают пробирку и инкубируют 15 мин при 50 °C. Если ожидается после расщепления образование N-концевого остатка глутамина, то инкубацию ведут 5 мин (при этом уменьшается вероятность циклизации глутамина в пирролидонкарбоновую кислоту).

10. Пептид высушивают над гидроксидом натрия, в случае необходимости добавляют 50 мкл этанола и снова упаривают.

11. Добавляют 100 мкл деионизованной воды. На вибромешалке тщательно перемешивают с 1 мл бутилацетата и разделяют фазы на настольной центрифуге (5 мин). Органическую фазу удаляют, тщательно контролируя, чтобы не захватить возможный осадок нерастворимого пептида на границе двух фаз. Промывку бутилацетатом повторяют дважды.

12. Водную фазу высушивают и растворяют в 1%-ном триэтиламине. Часть раствора берут на дансилирование, остаток высушивают и проводят следующий цикл деградации по Эдману. Если необходимо прервать процесс, то делают это всегда после стадии расщепления.

Замечание. Для ускорения высушивания образцов можно использовать вакуумную центрифугу (Speed Vac Concentrator фирмы Savant Instruments).

Литература

1. *Chang J. Y., Brauer D., Wittman-Liebold B.*, FEBS Lett., **93**, 205—214 (1978).
2. *Edman P., Begg G.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80—91 (1967).
3. *Edman P., Henschen A.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), 2nd ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975, pp. 232—279.
4. *Gray W. R.*, Ph. D. Thesis, Cambridge University, 1964.
5. *Gray W. R.*, Methods Enzymol., **25**, 121—138 (1972).
6. *Gray W. R.*, Methods Enzymol., **25**, 333—344 (1972).
7. *Hartley B. S.*, Biochem. J., **119**, 805—822 (1970).

Глава 12

МЕТОДЫ ТВЕРДОФАЗНОГО АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Б. ВИТТМАН-ЛИБОЛЬД (B. WITTMANN-LIEBOLD, *Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abteilung Wittman, Ihnestrasse 63—73, D-1000 Berlin 33 (Dahlem)*).

12.1. Введение

Впечатляющие успехи, достигнутые в последние десятилетия в определении первичной структуры белков, стали возможны благодаря, во-первых, введению в практику метода последовательного отщепления аминокислот от пептидов и белков при помощи фенилизотиоцианата (ФИТЦ) [14] и, во-вторых, разработке автоматического варианта этого метода [15]. Фенилизотиоционат до сих пор сохранил свое значение для определения аминокислотной последовательности белков. Во многих лабораториях все еще пользуются ручными вариантами определения последовательности (например, методика, объединяющая отщепление по Эдману с идентификацией ДНС-аминокислот [19], полуавтоматический вариант определения с использованием ФИТЦ или недавно разработанный метод, основанный на совместном использовании 4-N,N′-диметиламиноазобензол-4′-изотиоцианата (ДАБИТЦ) и ФИТЦ [58]. Ручные модификации метода применяются по следующим причинам:

1) анализ аминокислотной последовательности часто проводится либо небольшими группами аналитиков-белковиков, либо лицами, не специалистами в химии белка. В обоих случаях трудно приобрести секвенатор и обеспечить его техническое обслуживание;

2) при наличии квалифицированного персонала использование методик ручного анализа позволяет успешно проводить определение;

3) один человек может работать одновременно с 8—16 пептидами.

Хотя автоматический анализ требует бóльших затрат труда и средств для поддержания оборудования в работоспособном состоянии, он имеет преимущества перед ручными методами (абсолютная воспроизводимость условий для всех циклов отщепления, более эффективное удаление кислорода, каждый цикл отщепления проходит с более высоким выходом, возможна круглосуточная работа прибора). Кроме того, можно с успехом анализировать нерастворимые пептиды или те пептиды, которые

в ходе анализа становятся очень гидрофобными. Для реализации очевидных преимуществ автоматического метода были разработаны различные варианты секвенаторов: жидкофазного (ЖФ) [15, 64], твердофазного (ТФ) [27, 35], газофазного (ГФ) [22] (см. в гл. 17 обсуждение последних достижений газофазного метода). В этой главе рассмотрен только ТФ-метод.

Принцип ТФ-анализа аминокислотной последовательности заключается в ковалентном связывании пептида с нерастворимым носителем и последующим отщеплении (при помощи ФИТЦ) аминокислот от пептида, связанного с носителем. Разработан набор методов присоединения пептидов и белков к носителям, применяемым в виде шариков (производные полистирола или стекла, содержащие различные функциональные группы [33]). Носитель с ковалентно присоединенным пептидом (пептидил-носитель) можно упаковать в колонку и тщательно промыть реагентами и растворителями, используемыми в процессе анализа (при этом в отличие от ЖФ-метода нет опасности вымывания образца). После проведения полного цикла отщепления анилинотиазолинон АТЗ-аминокислоты вымывают из колонки, а пептид, укороченный на одну аминокислоту, остается присоединенным к носителю и доступным для проведения следующего цикла реакций.

ТФ-секвенатор легче обслуживать, чем жидкофазный, но новички часто затрудняются в выборе наилучшего метода присоединения конкретного пептида. Поэтому в данной главе в основном рассматриваются наиболее эффективные (с нашей точки зрения) методы синтеза носителей и присоединения пептидов. В настоящее время для анализа последовательности используют как большие, так и очень малые навески образца. Поэтому излагаемые в этой главе методы рассчитаны на работу с количествами от 500 пмоль до 20 пмоль пептида. Описываются только те методы, при использовании которых мы получали удовлетворительные результаты на пептидах, выделенных из реальных биологических объектов. Более подробную информацию можно найти в статьях, посвященных анализу на микроуровне [25, 52, 63], а также в обзорах по методам анализа последовательности [70, 71].

12.2. Материалы

12.2.1. Растворители

Для ТФ-анализа не обязательно использовать растворители высшей степени чистоты; в большинстве случаев достаточно, чтобы они имели квалификацию «ч. д. а.». Данные по определению аминокислотной последовательности, проведенные в раз-

ных лабораториях с использованием реактивов разных фирм, дали сходные результаты. Однако для анализа на микроуровне необходимы растворители, свободные от примесей, присутствие которых может привести к образованию побочных продуктов, влияющих на результаты идентификации. Поэтому ниже приводятся методики очистки растворителей. Следует контролировать качество каждой очищенной партии, так как степень очистки может меняться от партии к партии.

Следует обязательно проверять наличие альдегидов и пероксидов в реактивах и растворителях; рекомендуется проводить (без добавления пептида) все этапы методики присоединения образца к носителю и использовать обработанный таким образом носитель для анализа на секвенаторе (холостой опыт).

Если на хроматограммах ГЖХ или ВЭЖХ отсутствуют пики примесей, а на пластинках ТСХ не обнаруживаются пятна при анализе тех же аликвот, что и при анализе структуры пептидов, то качество растворителей (реактивов) признается удовлетворительным. Кроме того, рекомендуется проводить пробные определения с использованием полипептидов известной структуры.

12.2.1.1. Методики очистки [68, 72].

Ацетон (фирма Merck, марка «для анализа»). 2,5 л ацетона пропускают через колонку (внутренний диаметр 35 мм), заполненную силикагелем (высота слоя 80 мм) марки «Silica 100—200, активный» и нейтральным оксидом алюминия (Alumina N активность I, фирма Woelm Pharma) и перегоняют в стеклянном приборе ($t_{кип}$ 56 °С). Растворитель хранят над молекулярными ситами типа 13х, фракция 1/16″ (фирма Packard) или над ситами типа 3 Å, диаметр частиц 2 мм (фирма Merck).

Ацетонитрил (фирма Merck, марка «для анализа»). Очищают так же, как ацетон. $t_{кип}$ 81—82 °С. Хранят под азотом при 10 °С.

1,2-Дихлорэтан (фирма Merck, марка «для анализа»). Очищают и хранят, как ацетонитрил. $t_{кип}$ 84 °С.

Диметилформамид (ДМФА) (фирма Merck, марка «для анализа»). Перегоняют смесь 263 мл ДМФА+34 мл бензола+12 мл воды; первые 60 мл дистиллята, кипящего до 150 °С, отбрасывают; фракцию, кипящую выше 150 °С, собирают и перегоняют над P_2O_5 при пониженном давлении (водоструйный насос). ДМФА хранят над молекулярными ситами, как ацетон (см. выше).

Этаноламин (фирма Merck, марка «для синтеза»). Перегоняют под вакуумом (15 мм рт. ст.) при 77 °С. Молекулярная масса 61,08. Хранят в ампулах под азотом при —20 °С.

N-Этилморфолин (фирма Merck, марка «для синтеза»). Перегоняют дважды: сначала над борогидридом натрия, затем над нингидрином. Затем перегоняют на колонке, заполненной стеклянными кольцами. $t_{кип}$ 138—139 °С. Хранят в ампулах под азотом при —20 °С.

Метанол (фирма Merck, марка «Uvasol»). Очищают и хранят, как ацетонитрил. $t_{кип}$ 64 °С.

N-Метилморфолин (фирма Merck, марка «для синтеза»). Очищают, как N-этилморфолин. $t_{кип}$ 115—116 °С. Хранят в ампулах под азотом при —20 °С.

Пиридин (фирма Merck, марка «для анализа»). Перегоняют последовательно над едким кали, нингидрином и вновь над едким кали. $t_{кип}$ 114—116 °С. Хранят в ампулах под азотом при —20 °С.

Толуол (фирма Merck, марка «для анализа»). Очищают, как ацетон, перегоняют над $CaSO_4 \cdot 0,5H_2O$ (прокаленным при 500 °С непосредственно перед использованием). $t_{кип}$ 110—111 °С. Хранят над молекулярными ситами, как ацетон.

Триэтиламин (фирма Merck, марка «для синтеза»). Перегоняют над фталевым ангидридом. $t_{кип}$ 89 °С. Хранят в ампулах под азотом при —20 °С.

Триэтилентетрамин (фирма Fluka, марка «для практики»). Очищают, как триэтиламин, перегоняют при пониженном давлении (водоструйный насос). Хранят в ампулах под азотом при —20 °С.

Трифтороуксусная кислота (ТФУ) (фирма Fluka, марка «ч.»). Перегоняют над $CaSO_4 \cdot 0,5H_2O$ (прокаленным при 500 °С непосредственно перед использованием) с колонкой, заполненной стеклянными кольцами. $t_{кип}$ 72—73 °С. Хранят порциями по 50 мл в колбах со стеклянными пробками под азотом при —20 °С.

Вода. Дважды перегоняют в стеклянном приборе. Используют свежеперегнанной.

12.2.2. Реагенты

Метилизотиоцианат (МИТЦ) (фирма Fluka, марка «х. ч.») и *фенилизотиоцианат* (ФИТЦ) (фирма Fluka, марка «х. ч.»). Перегоняют в вакууме (масляный насос) под азотом, собирают фракцию, кипящую при 4 °С. Хранят в виде небольших порций в ампулах при —20 °С.

п-Фенилендиизотиоцианат (ДИТЦ) (фирма Eastman). Если реактив окрашен в желтый цвет, его перекристаллизовывают из кипящего ацетона: 2 г ДИТЦ растворяют в 10 мл ацетона и медленно охлаждают. Выход 1,55 г (игольчатые кристаллы, дающие прозрачный бесцветный раствор в ДМФА). $t_{пл}$ 129—131 °С.

4-N,N-Диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат (ДАБИТЦ) (фирма Fluka или Pierce). Перекристаллизовывают из ацетона: 1 г ДАБИТЦ растворяют в 70 мл кипящего ацетона, фильтруют через бумажный фильтр и медленно охлаждают. Выход ~0,7 г оранжево-красных или коричневых игольчатых кристаллов. $t_{пл}$ 169—170 °С.

1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид·HCl (ЭКД) фирма Serva). $t_{пл}$ 112—115 °С.

3-Аминопропилтриэтоксисилан (фирма Pierce)

N-β-Аминоэтил-(3-аминопропил) триметоксисилан (фирма Pierce).

12.2.3. Стеклянные шарики для разбавления навески полимеров

Шарики для кипячения с обратным холодильником (Kristall Dragon Werk, фирма Georg Wild, № 31/18) и *стеклянные шарики 200—235 меш* (Micro-beads фирма Division of Cataphote Corp.). Шарики промывают петролейным эфиром, затем ~2 ч нагревают в концентрированной соляной кислоте для удаления примесей ионов металлов; тщательно промывают на стеклянном фильтре водой и метанолом, сушат при 100 °С.

Коммерчески доступны отмытые кислотой, силанизированные триметилхлоросиланом шарики (фирма Pierce). Считается, что их применение обеспечивает лучшие скорости потока жидкости через колонку. Однако часто используются и несиланизированные частицы.

12.2.4. Носители

Шарики полистирола (сополимер стирола с 1% дивинилбензола) (марка Biobeads S-XI, minus 400 меш, фирма BioRad Laboratories). Непосредственно перед использованием их несколько раз промывают бензолом, хлоро-

формом, диоксаном, метанолом. Хранят при 4 °С. (Марка Biobeads S-XI, 200—400 меш, хлорометированный, фирма BioRad Laboratories.)

Аминополистирол (АПС) и *триэтилентетраминполистирол* (ТЭТА-полистирол) (фирма Pierce). Поскольку качество коммерческих образцов носителей может меняться, а их устойчивость на воздухе ограничена, рекомендуется синтезировать эти смолы из полистирола, как указано ниже, и хранить их под азотом в ампулах при —20 °С.

Стекло с контролируемым размером пор Corning CPG-10, 200—400 меш (фирмы Electronucleonics, Serva, Pierce, Machery-Nagel). Доступны стекла CPG с различными размерами частиц и пор. Чаще всего используют шарики с диаметром 40—80 мкм (200—400 меш) с номинальным диаметром пор 75 Å. В последнее время стали использовать частицы с бо́льшим диаметром пор (85—240 Å). Считается, что к частицам с большим диаметром пор лучше присоединяются объекты с большой длиной полипептидной цепи (белки) [41]. Однако наш опыт не подтверждает это мнение.

3-Аминопропильное стекло (АПС), 10/75, 200—400 меш (фирма Pierce) и *β-N-Аминоэтил-(3-аминопропил)стекло* (β-АПС), 200—400 меш (фирма Pierce). Следует использовать только бесцветные АПС или β-АПС. Образцы стекол нашего собственного изготовления (см. ниже) дают более воспроизводимые результаты и лучшие выходы присоединения полипептидов.

12.2.5. Буферы для присоединения

Буфер № 1. N-метилморфолин — ТФУ, pH 9,5. Смешать 5 мл N-метилморфолина и 5 мл воды; pH раствора 11,4. Добавить 4 капли ТФУ, доведя pH до 9,5. Использовать свежеприготовленный буфер, хранить под азотом.

Буфер № 2. Пиридин — соляная кислота, pH 5,0. К 80 мл воды добавить 8 мл пиридина, затем 5,3 мл 32%-ной соляной кислоты и довести водой до конечного объема 100 мл (pH 5,0). Хранить под азотом.

Буфер № 3 (безводный). ДМФА — триэтиламин. К 200 мл ДМФА добавить 2 мл триэтиламина. Присоединение проводят также в безводном ДМФА, но без добавления триэтиламина (см. присоединение по карбоксилу).

Буфер № 4. Бикарбонатный, pH 9,0. 0,1 *М* бикарбонат натрия доводят до pH 9,0 1 *М* едким натром; буфер содержит 10% (об./об.) 2-пропаноламина.

12.2.6. Растворы реагентов и буферов для секвенатора

Следует использовать реагенты и растворители, очищенные, как изложено выше.

Буфер № 1 для реакции конденсации: пиридин — N-метилморфолин — трифтороуксусная кислота. 28 мл N-метилморфолина растворяют в 190 мл воды, добавляют 3,75 мл ТФУ, доводят водой до объема 200 мл; pH полученного раствора 8,1. К этому буферу добавляют пиридин в соотношении (2 : 3), после чего pH конечного раствора 7,9. Следует использовать свежеприготовленный буфер, хранить под азотом.

Буфер № 2 для реакции конденсации (безводный): ДМФА — триэтиламин. К 97,5 мл ДМФА добавить 2,5 мл триэтиламина.

Буфер № 3 для реакции конденсации (при анализе на микроуровне с использованием ДАБИТЦ — ФИТЦ): пиридин — N-этилморфолин — трифтороуксусная кислота — ДМФА. В 22,5 мл воды под азотом растворить 4,5 мл N-этилморфолина. Добавить несколько капель ТФУ, затем воду до объема 30 мл (pH полученного раствора 9,1). К 10 мл этого буфера добавить 20 мл ДМФА и 20 мл пиридина, дегазировать. Хранить под азотом.

Раствор метилизотиоцианата (МИТЦ) в ацетонитриле. Растворить 1 г МИТЦ в 1 мл ацетонитрила.

Раствор фенилизотиоцианата (ФИТЦ): 10%-ный раствор ФИТЦ в ацетонитриле. К 50 мл ацетонитрила добавить под азотом 5 мл ФИТЦ.

Раствор ФИТЦ № 2 (для анализа на микроуровне с ДАБИТЦ — ФИТЦ): 5%-ный ФИТЦ в ДМФА. К 19 мл ДМФА под азотом добавить 1 мл ФИТЦ.

Раствор ДАБИТЦ (для анализа на микроуровне): 0,5%-ный ДАБИТЦ в ДМФА. К 20 мл ДМФА под азотом добавить 100 мг ДАБИТЦ. Готовить свежий раствор каждые 24 ч.

Растворитель для анализа на микроуровне: 0,2%-ный триэтиламин в метаноле. К 500 мл метанола под азотом добавить 1 мл триэтиламина.

12.3. Синтез смол

12.3.1. Смолы на основе полистирола

Исходным материалом для синтеза модифицированных смол на основе полистирола служит сополимер стирола с 1% дивинилбензола (Biobeads S-XI, фирма Biorad). На рис. 12.1 приведены схемы синтеза некоторых смол.

Полимеры, предназначенные для твердофазного анализа последовательности, должны обладать двумя существенными особенностями:

1) функциональные группы полимера должны быть доступны для пептидов и реагентов;

2) смола должна быть химически и механически устойчива в условиях реакции Эдмана.

12.3.1.1. Способность к набуханию. Для определения степени набухаемости смолы измеряют высоту слоя смолы (в небольшой плоскодонной пробирке) до и через 1 ч после добавления растворителя [27]. Отношение объемов набухшей и сухой смолы (V_s/V_d) должно составлять по крайней мере 3÷5 для того, чтобы реагенты могли проникать внутрь частиц гидрофобного полимера. После синтеза смол на основе полистирола следует сравнить их способность к набуханию со значениями, представленными в табл. 12.1. Шарики идеального носителя для анализа последовательности должны быть небольшими по размеру, иметь малый разброс по диаметру частиц, что существенно для упаковки хроматографической колонки; сохранять постоянный объем набухания и устойчивость ко всем реагентам и растворителям, используемым в процессе определения последовательности. Однако смолы, наиболее пригодные для анализа структуры полипептидов, сильно набухают в пиридине, ДМФА, 1,2-дихлороэтане, ТФУ. Поскольку эти смолы лишь частично удовлетворяют вышеуказанным идеальным требованиям и изменение их объема в процессе определения структуры ведет к закупорке колонки

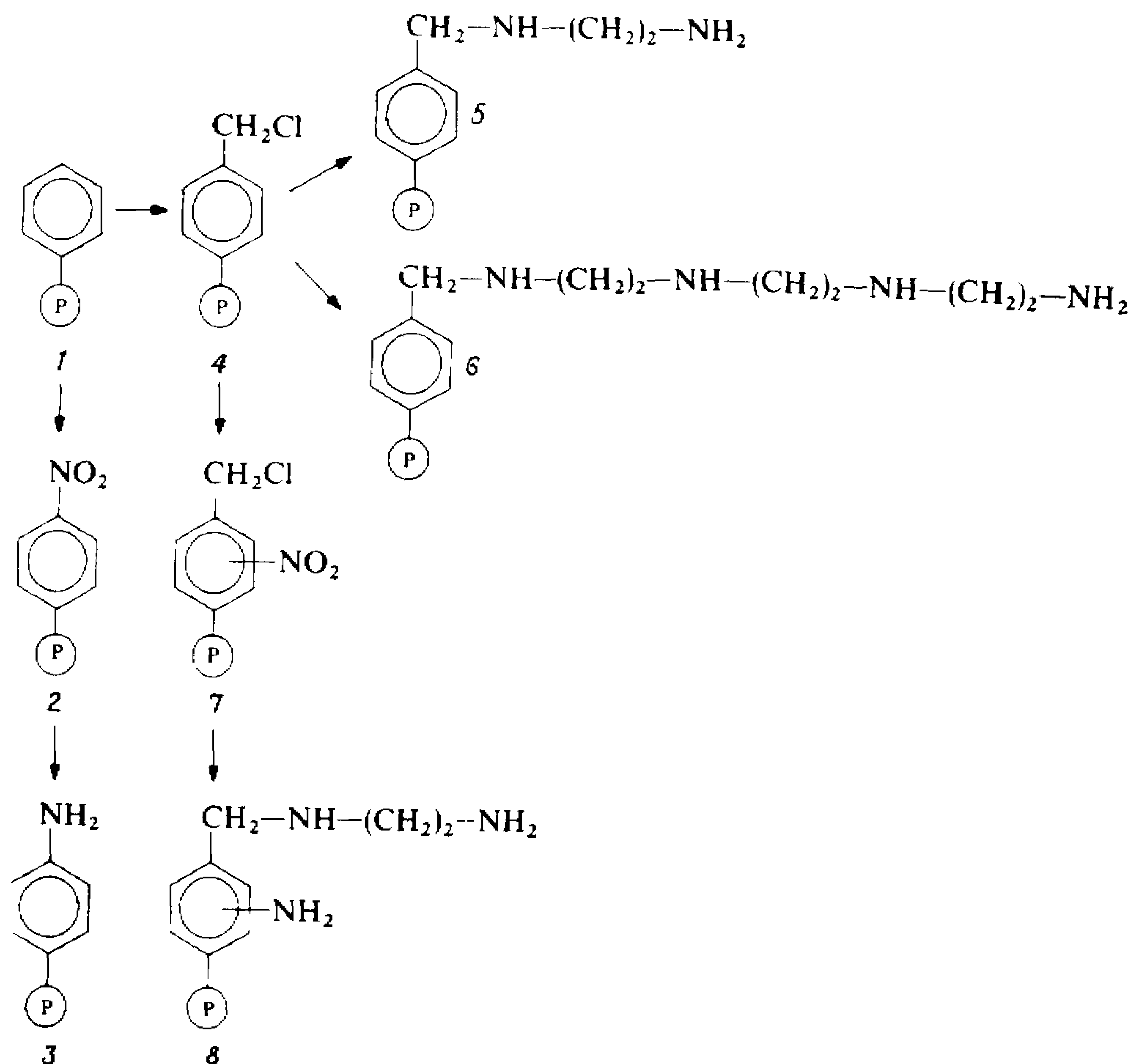


РИС. 12.1. Синтез носителей на основе поперечно-сшитого полистирола. *1* — сшитый полистирол, *2* — нитрополистирол, *3* — аминополистирол, *4* — хлорометилированный полистирол, *5* — этилендиаминополистирол, *6* — триэтилентетраминополистирол, *7* — нитрохлорометилполистирол, *8* — аминоэтилендиаминополистирол. Метод получения соединений 3 и 8 описан в тексте. Синтез остальных носителей см. в работе [29].

или же к неэффективному проникновению реагентов и растворителей в поры носителя, то перед заполнением колонки смолы «разбавляют» стеклянными шариками (30-кратное «разбавление» по массе) (см. разд. 12.5.2).

12.3.1.2. Синтез аминополистирола. В исходную методику [28, 30] внесены некоторые изменения.

Синтез нитрополистирола. 5 г полистирола (Biobeads S-XI, minus 400 меш) тщательно промывают последовательно бензолом, хлороформом, диоксаном, метанолом, расходуя по 200 мл каждого растворителя; продолжительность каждой промывки

Таблица 12.1. Способность к набуханию смол на основе полистирола[а]

Смола		Метанол		Пиридин		ДМФА		ТФУ	
	V_D, мкл	V_S, мкл	V_S/V_D	V_S, мкл	V_S/V_D	V_S, мкл	V_S/V_D	V_S, мкл	V_S/V_D
Полистирол (Bio-beads S-XI Minus 400 меш)	140	200	1,4	750	5,4	400	2,3	200	1,4
Хлорометилированный полистирол (Biobeads) S-XI 200—400 меш)	150	170	1,1	600	4,0	550	3,7	300	2,0
Аминополистирол[б]	155	200	1,3	250	1,6	700	4,5	850	5,5
ТЭТА-полистирол[в]	180	500	2,8	600	3,3	500	2,8	650	3,6

[а] Объем сухой (V_D) и набухшей смолы (V_S) и отношение V_S/V_D определяли по Ларсену [27]: после центрифугирования измеряли объем 100 мг смолы, обрабатывали ее 2 мл каждого растворителя, перемешивали, выдерживали 60 мин при комнатной температуре, центрифугировали, измеряли объем набухания.

[б] Синтез описан в разд. 12.3.1.2.

[в] Синтез описан в разд. 12.3.1.3.

30 мин. Затем промывают метанолом на металлическом сите (60 мкм) для удаления больших частиц, сушат шарики в вакууме. Выход ~4 г. В охлажденную до −3 °С дымящую (90%-ную) азотную кислоту (55 мл) небольшими порциями в течение 15 мин при перемешивании добавляют смолу, поддерживая температуру не выше −3 °С. Перемешивают смесь 1 ч при 0 °С. Смесь выливают на 500 мл льда и собирают смолу на пористом стеклянном фильтре. Промывают попеременно диоксаном (4 раза по 200 мл) и водой (4 раза по 200 мл), затем метанолом (2 раза по 200 мл). Просеивают через сито (60 мкм) для удаления крупных частиц смолы и высушивают нитрополистирол в вакууме. Выход 6—7 г.

Синтез аминополистирола. Перемешивают суспензию 6,3 г нитрополистирола в 115 мл ДМФА при 140 °С (масляная баня). Медленно добавляют 48 г $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ в 40 мл ДМФА (экзотермическая реакция), затем выдерживают реакционную массу 30 мин при 140 °С. Охлаждают смесь до 100 °С и добавляют 41 мл концентрированной соляной кислоты. Термостатируют при 95 °С в течение 1 ч, собирают смолу на пористом стеклянном фильтре. Промывают 2 *М* HCl (2 раза по 200 мл), водой (2 раза по 200 мл), просеивают через сито (100 мкм) для отделения грубых частиц смолы. Повторяют промывку 2 *М* HCl

и водой, затем смесью ДМФА — триэтиламин (3 : 1, 2 раза по 200 мл) до отсутствия ионов хлора в промывках. Продукт (смола темно-зеленого цвета) промывают водой и еще раз просеивают через сито (100 мкм). Промывают метанолом (2 раза по 200 мл) и вновь просеивают через сито (60 мкм). Желто-коричневую смолу сушат в вакууме при 60 °С. Выход 5,5 г.

Хранение смолы. Аминополистирол при комнатной температуре сохраняет свои свойства и характеристики всего один месяц. Небольшие количества можно хранить под азотом в запаянных ампулах при −20 °С. В таких условиях смола сохраняет свои свойства до одного года.

Способность к набуханию. Полимер легко набухает в ДМФА и ТФУ, хуже — в пиридине и метаноле (табл. 12.1).

12.3.1.3. Синтез триэтилентетраминополистирола (ТЭТА-полистирола). ТЭТА-полистирол получают по методике, описанной в работах [24, 30]. Промывают частицы хлорометилированного полистирола (Biobeads S-XI) бензолом, хлороформом, диоксаном и метанолом; сушат в вакууме. Перемешивают 1 г свежеприготовленной смолы с 15 мл триэтилентетрамина (ТЭТА) в течение 30 мин при комнатной температуре, затем нагревают на масляной бане при 115 °С еще 90 мин. Собирают смолу на пористом стеклянном фильтре, тщательно промывают 20 мл триэтиламина в течение 30 мин при комнатной температуре, фильтруют. Промывают попеременно метанолом, водой (каждым растворителем 3 раза по 200 мл), промывают еще раз водой, центрифугируют. Кипятят смолу в 50 мл 1 М соляной кислоты в течение 2 ч для удаления следов несвязанного ТЭТА, фильтруют. Промывают водой, триэтиламином, водой, метанолом (каждым растворителем 2 раза по 1 мл). Сушат в вакууме в течение ночи. Выход ~1 г.

Хранить, как аминополистирол. По стабильности ТЭТА-полистирол уступает аминополистиролу. После нескольких месяцев хранения при использовании в реакции Эдмана возрастает фон загрязнений.

Способность к набуханию хорошая (табл. 12.1). Следует промывать смолу непосредственно перед использованием, для чего используют растворители: ДМФА (2 раза по 1 мл), метанол (2 раза по 1 мл), триэтиламин (15 мл в течение 20 мин), воду, метанол; сушат в вакууме.

12.3.2. Носители на основе стекла

Пористые стеклянные шарики были предложены в качестве носителей для твердофазного анализа в 1973 г. [42, 61, 62].

12.3.2.1. Свойства стекла с контролируемым размером пор (фирма Corning). Стекла марки CPG содержат 96% кремнезема, 3—4% B_2O_3, 0,5—1% Na_2O и следовые количества оксидов некоторых металлов. Выпускаются в виде пористых шариков, как необработанных, так и модифицированных разными химическими методами, что делает стекла пригодными для многих целей.

Скорость разрушения стекла CPG. Шарики очень устойчивы к механическим повреждениям; скорость разрушения этих носителей зависит от температуры, времени, pH, состава и объема раствора, площади поверхности частиц (чем меньше размер пор, тем больше площадь поверхности). Устойчивость стекла заметно снижается во времени в присутствии ТФУ; эти носители чувствительны к фтороводороду.

Преимущества использования пористых стекол для анализа аминокислотной последовательности. Шарики CPG сохраняют постоянный объем в ходе всего цикла отщепления, не подвержены набуханию — сжатию, поэтому в отличие от носителей на основе органических полимеров ими можно заполнять колонки без разбавления другими материалами. Стекла нечувствительны к давлению в колонке, поэтому жидкости можно прокачивать через колонку с высокой скоростью. Они химически устойчивы во всех средах, за исключением сильных оснований, особенно при высоких температурах, поэтому присоединение пептидов к носителям следует проводить при $pH<10$.

Современная методика использования стекол CPG описана в работе [32]. Белок присоединяют за N-концевую аминокислоту к носителю, частично расщепляют бромоцианом. Смесь пептидов смывают со стекла и анализируют их структуру дансильным методом с двойной радиоактивной меткой. Можно использовать и другие методы расщепления белка.

12.3.2.2. Получение носителей, содержащих аминогруппы. Для получения аминопропилстекла (АПС) и β-N-аминоэтил-(3-аминопропил)стекла (β-АПС) пористые шарики (CPG, 10/75, 200—400 меш) обрабатывают 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС) и β-аминоэтил-(3-аминопропил)триметоксисиланом (АЭАПТМС) [6, 17, 51, 61]. Такая модификация шариков с номинальным диаметром пор 75 Å позволяет получить носители с емкостью связывания пептидов 150—170 нмоль/мг стекла [61]. Схема синтеза приведена на рис. 12.2.

Методика. 4 г шариков (CPG, 10/75, 200—400 меш, фирма Serva) деаэрируют 2 ч при 180 °С в вакууме (водоструйный насос). Добавляют 30 мл сухого толуола и 3 мл АПТЭС (или АЭАПТМС). Деаэрируют и нагревают в закрытой колбе при 75 °С в течение 24 ч с легким перемешиванием (предпочтительно под азотом). Носитель отделяют от раствора на стеклянном фильтре, промывают последовательно толуолом, ацетоном, метанолом

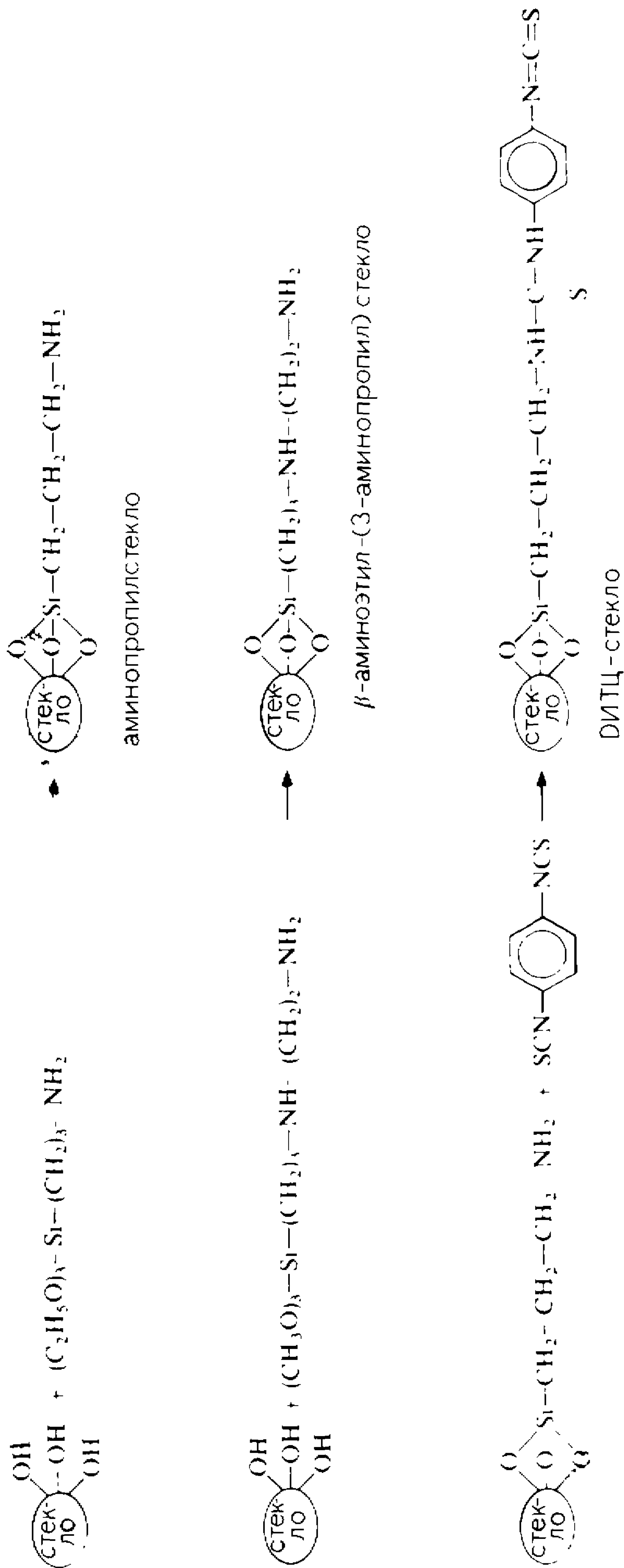


РИС. 12.2. Получение аминопропилстекла (АПС), β-N-аминоэтил-(3-аминопропил)стекла (β-АПС) и изотиоцианатстекла (ДИТЦ-стекло).

(каждым растворителем 2 раза по 50 мл). Сушат в вакууме над P_2O_5 при комнатной температуре. Хранят под азотом при 4 °С.

12.3.2.3. Получение изотиоцианатного стекла. Для синтеза изотиоцианатаминопропильного носителя (ИТЦ-АПС), к которому можно присоединять пептиды, содержащие остатки лизина и аминоэтилцистеина, аминогруппы аминопропильного стекла активируют *п*-фенилендиизотиоцианатом (ДИТЦ) (рис. 12.2) [43, 61].

Методика. Для проведения реакции рекомендуется использовать 25 моль ДИТЦ на каждую аминогруппу носителя и 2—3 объема ДМФА на объем стекла. 1 г ДИТЦ растворяют в 13 мл ДМФА. При легком перемешивании порциями в течение 1 ч добавляют 2 г аминопропилстекла. Смесь выдерживают при комнатной температуре 2 ч. Шарики промывают на стеклянном фильтре ацетоном и ДМФА (2 раза по 50 мл), метанолом (2 раза по 10 мл). Носитель сушат в вакууме.

Хранят, как АПС.

12.3.3. Определение содержания аминогрупп в носителях на основе органических полимеров или пористых стекол

Определив число аминогрупп, можно оценить изменение свойств носителя при хранении и провести сравнение свойств различных партий одного и того же носителя. См. также разд. 8.2.1.

12.3.3.1. Методики.

Методика 1 [33]. Аминогруппы носителя алкилируют тринитробензолсульфокислотой. Гидролиз едким кали расщепляет связи Si—O стекла и превращает тринитрофенильные группы в пикриновую кислоту, содержание которой можно измерить фотометрически. Воспроизводимость метода — несколько процентов.

Смешивают в небольшой пробирке 50 мг 3-аминопропилстекла с 15 мг тринитробензолсульфокислоты в 1 мл 0,1 *М* $NaBO_2$ (pH 9,07). Перемешивают в течение 1,5 ч вращением пробирки в горизонтальной плоскости. Промывают водой (3 раза по 8 мл), центрифугируют. К влажному носителю прибавляют 1 мл 2 *М* KOH, перемешивают 60 мин при 45 °С. Разбавляют водой и измеряют поглощение при 358 нм. Рассчитывают содержание аминогрупп, учитывая, что в щелочной среде пикриновая кислота имеет $\varepsilon_{358}=14\,100$. Для аминопропилстекла содержание аминогрупп обычно составляет 25—150 мкм/г носителя [29].

Методика 2 [18]. Набухший полимер реагирует с пикриновой кислотой, образующей соль с аминогруппами носителя. Полимер обрабатывают избытком сильного основания, переводя связанный пикрат в раствор, где и измеряют его содержание.

50 мг носителя замачивают в 1,2-дихлороэтане на 5 мин. Нейтрализуют 5%-ным (об./об.) раствором диизопропилэтиламином в дихлорметане в течение 3 мин. Обрабатывают 0,1 *М* пикриновой кислотой в дихлорметане (3 мин). Промывают носитель дихлорметаном (5 раз по 2 мл). Элюируют пикрат 5%-ным диизопропилэтиламином в дихлорметане (2 порции по 3 мл), промывают смолу дихлорметаном (3 раза по 2 мл). Разбавляют раствор 95%-ным этанолом и измеряют поглощение. Для пикрата диизопропилэтиламина в диапазоне концентраций $1\div20\cdot10^{-5}$ моль/л (в этаноле, содержащем $\leqslant20\%$ дихлорметана) $\varepsilon_{358}=14\,500$.

Методика 3 [56]. Аминогруппы носителя превращают в связанное основание Шиффа реакцией с 2-гидрокси-1-нафтальдегидом, которое затем переводят в раствор обработкой бензиламином. Концентрацию основания Шиффа в растворе определяют спектрофотометрически.

1—5 мг носителя смешивают с 2 мл 0,2 *М* 2-гидрокси-1-нафтальдегида в ДМФА и оставляют на 15 ч при комнатной температуре. Промывают смолу ДМФА (4 раза по 3 мл), затем этанолом до полного отсутствия поглощения при 270 нм в промывных фракциях. Добавляют 2 мл 0,4 *М* бензиламина в этаноле, выдерживают 45 мин при комнатной температуре. Центрифугируют, измеряют поглощение при 420 нм. Для основания Шиффа $\varepsilon_{420}=10\,900$ (в этаноле). Для твердофазных носителей емкость по связыванию определяется числом аминогрупп, приходящихся на единицу массы носителя и доступных для присоединения.

12.4. Методы присоединения

12.4.1. Присоединение лизилсодержащих пептидов с помощью ДИТЦ [28, 61]

Пептиды, содержащие остатки лизина, расположенные как внутри цепи, так и на С-конце полипептида, а также пептиды, содержащие аминоэтилцистеин, могут быть эффективно присоединены своими свободными аминогруппами к смолам на основе полистирола или к аминопропильным стеклам (АПС или β-АПС) при помощи ДИТЦ (рис. 12.3). Разновидностью «ДИТЦ-метода» является использование бифункционального реагента — лактона N-(*п*-изотиоцианатобензоил)-DL-гомосерина для присоединения лизилсодержащих пептидов к носителям на основе стекла, содержащим аминогруппы. Сообщается о высоких выходах присоединения [21].

12.4.1.1. Методики присоединения.

Преимущества. Выходы в реакциях присоединения обычно очень высокие (80—90%). При сравнении различных полистирольных носителей в реакции Эдмана пептидиламинополистирол дает наименьший выход побочных продуктов. Ранее для присоединения небольших пептидов (содержащих 25—30 аминокислот) наилучшим носителем считался аминополистирол, тогда как более длинные пептиды и белки связывали преимущественно со стеклами (аминопропилстекло или β-аминопропилстекло). В настоящее время разработаны методы присоединения пептидов меньшего размера к стеклянным носителям (разд. 12.4.2—12.4.4).

Ограничения.

1. Условия присоединения могут вызвать снижение растворимости некоторых пептидов, ведущее к низким выходам присоединения. Для предотвращения потерь следует проводить контрольные испытания во время и после завершения процесса присоединения (разд. 12.4.5). Некоторые из пептидов, не-

NH_2—CH(R₁)—C(=O)—NH—(A₂)—(A₃)—(A₄)···(Lys)(NH_2)—COOH → (1. NCS—C_6H_4—NCS; 2. Смола(NH_2, NH_2)) → Смола—NH—C(=S)—NH—C_6H_4—NH—C(=S)—NH—CH(R_1)—C(=O)—NH—(A₂)—(A₃)—(A₄)···(Lys)—COOH

→ (H⁺) → Смола—NH—C(=S)—NH—C_6H_4—NH—тиазолинон(R_1, H) + NH_2—(A₂)—(A₃)—(A₄)···(Lys)—COOH

Отщепление по Эдману +Конверсия → PTH—A_2;—A_3; .....

РИС. 12.3. Присоединение пептидов к носителям, содержащим аминогруппы; активация α- и ε-аминогрупп пептидов *n*-фенилендиизотиоцианатом.

растворимые в буфере для присоединения (его состав приведен ниже), можно растворить добавлением пиридина или ДМФА. Если это не помогает, то растворимость образца можно повысить изменением pH буфера (от 7,5 до 10). Иногда пептиды становятся растворимыми после предварительной обработки ТФУ и высушивания. Проблему растворимости помогает решить проведение конденсации в безводных условиях (ДМФА — триэтиламин) [60]. Лизилсодержащие пептиды можно также присоединять к аминополистиролу конденсацией с карбодимидом (КДИ) при pH 3—5 (разд. 12.4.4).

2. N-концевые аминокислоты и остатки лизина после отщепления от пептидной цепи остаются ковалентно связанными с носителями, поэтому их нельзя идентифицировать. Однако в случае неполного присоединения N-концевых аминокислот к смоле (стеклу) среди продуктов отщепления обнаруживают в небольших количествах ФТГ-производные N-концевых аминокислот. Обычно после пришивки пептида к носителю для блокирования оставшихся свободных аминогрупп смолы (стекла) используют метилизотиоцианат (МИТЦ). В этом случае образуется метилтиогидантоин (МТГ) первой аминокислоты [28]. Мы заменили МИТЦ на ФИТЦ, поэтому N-концевая аминокислота может быть определена в виде обычного ФТГ-производного. При анализе на микроуровне такая обработка не влияет на выходы отщепления при условии, что использовался перегнанный ФИТЦ.

3. ДИТЦ-метод неприменим в случае пептидов, имеющих С-концевой Arg, поэтому остаток Arg гидразинолизом превращают в Orn [28, 45]. Однако при гидразинолизе часто наблюдается расщепление пептидных связей внутри молекулы, например по остаткам Asn, что усложняет интерпретацию результатов отщепления аминокислот. Поэтому ДИТЦ-метод не рекомендуется использовать для пептидов, содержащих С-концевой Arg.

Методика присоединения. Конденсацию с аминополистиролом или со стеклянными носителями, содержащими аминогруппы, проводят при pH 9,5 по методике, описанной в работах [28, 59], или по модифицированной методике [30, 55, 61].

Емкость носителей: 1—3 нм пептида/мг полимера или 1 нм/мг стекла.

10—100 нмоль обессоленного пептида переносят в стеклянную пробирку (размер 5×130 мм) и высушивают в вакууме (масляный насос), предпочтительно в концентраторе (фирма Savant) или в эксикаторе; пептид можно также лиофилизовать. Растворяют пептид под азотом в 50 мкл буфера для присоединения (разд. 12.2.5). Проверяют pH (>9,0) и растворимость пептида. Отбирают аликвоту (2—5 мкл) для контроля методом ТСХ (разд. 12.4.5.1). Добавляют 1,0 мг ДИТЦ (5 мкм) в 100 мкл ДМФА, перемешивают под азотом 30 мин при 50 °С. В пожелтевшем растворе не должно быть осадка.

30—50 мг аминополистирола (или 100 мг аминопропилстекла) промывают ДМФА, оставляют набухать в 200 мкл ДМФА в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем носитель двумя порциями добавляют к пептиду, предварительно активированному ДИТЦ. Перемешивают смесь под

азотом 60 мин при комнатной температуре. Для удаления избытка аминогруппы носителя добавляют 100 мкл раствора ФИТЦ и 100 мкл буфера (разд. 12.2.6), перемешивают под азотом 60 мин при 30 °С, центрифугируют. Жидкость над осадком проверяют на содержание исходного пептида (разд. 12.4.5.2). Промывают носитель метанолом (3 раза по 8 мл), центрифугируют, сушат в вакууме. При использовании аминополистирола последний смешивают с 900 мг стеклянных шариков (разд. 12.2.3); такой смешанный носитель упаковывают в колонку.

12.4.2. ДИТЦ-метод с использованием изотиоцианатного стекла

12.4.2.1. Преимущества, ограничения и методика присоединения

Преимущества.

1. Присоединение белков и пептидов к носителям на основе стекла характеризуется более высоким выходом, чем при использовании смол на основе полистирола.

2. Легче представляется обычная проблема растворимости пептида в буфере для конденсации. При плохом растворении пептида в обычном буфере перед добавлением носителя можно попробовать добавить пиридин и (или) ДМФА. При конденсации ДИТЦ-активированного пептида с носителем, содержащем аминогруппы, реагент имеет разную склонность к выпадению в осадок в виде производного мочевины в зависимости от содержания воды, необходимой для растворения пептида.

3. Метод является быстрым в исполнении.

Ограничения. Метод применим только к пептидам, имеющим остатки лизина или аминоэтилцистеина. Пептиды, имеющие эти аминокислоты внутри цепи, можно анализировать только до указанных остатков, являющихся точками присоединения. Метод нельзя рекомендовать для аргинилсодержащих пептидов.

Методика присоединения [40, 41, 42, 62, 72]. Соотношение пептид: носитель 1 нмоль на мг стекла. Растворяют под азотом 10—200 нмоль пептида или белка в 30—100 мкл буфера № 1. Проверяют pH, растворимость (разд. 12.4.5). Добавляют 10—100 мг ДИТЦ—АПС (в сухом виде) и перемешивают под азотом 60 мин при 30 °С. Добавляют 50—100 мкл этаноламина и перемешивают в тех же условиях. Интенсивно промывают реакционную массу ДМФА, метанолом и эфиром (каждым растворителем 2 раза по 2 мл). Жидкость над осадком контролируют на содержание пептида; носитель сушат в вакууме.

Модифицированная методика. Если пептид нерастворим в буфере на основе N-метилморфолина, то конденсацию можно проводить в одной из следующих систем: 50%-ный водный пиридин; ДМФА, внесенный после добавления триэтиламина (буфер № 3) или N-метилморфолина; бикарбонат натрия (pH 9,0; буфер № 4) с добавлением (при необходимости) 1% ДСН. Найдено, что при конденсации В-цепи инсулина в буфере N-метилморфолин—ТФУ, pH 9,0 выход составляет 45—50%, а в натрийбикарбонатном буфере (pH 9,0) —66—70% [11].

12.4.3. Присоединение по лактону гомосерина

Для этой конденсации используют ТЭТА-полистирол [24, 33], а также стекла (АПС или β-АПС).

12.4.3.1. Преимущества, ограничения и методика присоединения.

Преимущества.

1. Для пептидов, содержащих гомосерин, выходы конденсации составляют 80—90%.

2. Можно определить полную последовательность таких пептидов, включая С-концевой остаток.

3. Кроме отщепленных аминокислот в растворе содержится мало других примесей при условии, что носитель хранили в ампулах под азотом при −20 °С и тщательно промывали непосредственно перед использованием.

4. Этим методом в продуктах бромоцианового гидролиза можно отделить пептиды, содержащие гомосерин, от С-концевого пептида, в котором отсутствует гомосерин.

Ограничения.

1. ТЭТА-полистирол довольно неустойчив; его нельзя хранить долго.

2. Следует тщательно промывать ТЭТА-полистирол перед использованием.

3. При работе с лизилсодержащими пептидами этот носитель менее эффективен, чем аминополистирол и аминопропилстекло, поскольку наблюдается увеличение фона примесей. Сообщалось, что обработка пептидилполимера N-ацетилимидазолом сразу же после конденсации пептида с полимером уменьшает число ложных нингидринположительных пятен при идентификации ФТГ-аминокислот.

Методика присоединения. Емкость носителя 1 нмоль/мг смолы. 50 мг ТЭТА-смолы или 100 мг 3-аминопропилстекла промывают (ДМФА, 4 раза по 2 мл); в случае ТЭТА-смолы дополнительно промывают триэтиламином (2 раза по 1 мл). В заключение промывают метанолом (2 раза по 2 мл) и ДМФА (2 раза по 1 мл).

Лактонизация пептида. Пептид сушат в вакууме над пентоксидом фосфора. Добавляют перегнанную безводную ТФУ (50—100 мкл на 5—20 нмоль пептида; 0,5 мл — на 50—200 нмоль) и оставляют на 1 ч при комнатной температуре под азотом. Продукт сушат на роторном испарителе или в концентраторе (Speed Vac Concentrator, фирма Savant), затем в вакууме над едким кали. Повторяют обработку ТФУ в течение 15 мин.

Присоединение. Лактон пептида растворяют в смеси 175 мкл ДМФА + +25 мкл триэтиламина; если пептид не растворяется, добавляют триэтиламин до концентрации 20%. Контролируют растворимость, отбирая пробы по 2—5 мкл. Добавляют под азотом раствор пептида к предварительно отмытой ТЕТА-смоле (или к 20 мг аминопропилстекла). Пробирку, содержащую пептид, ополаскивают ДМФА (2 раза по 100 мкл) и добавляют промывки к реакционной массе. Приливают 50 мкл триэтиламина, озвучивают ультразвуком, выдерживают, мягко перемешивая, под азотом 90 мин

при 45 °С, промывают ДМФА, метанолом и центрифугируют. Жидкость над осадком контролируют на содержание пептида.

Насыщение. К носителю добавляют 200 мкл раствора ФИТЦ в ацетонитриле (1 : 5, по об.) и 200 мкл буфера № 1 (разд. 12.2.6). Перемешивают под азотом 30 мин при 30 °С. Центрифугируют и промывают смолу ДМФА (2 мл) и метанолом (2 раза по 2 мл). Сушат смолу в вакууме.

12.4.4. Присоединение по карбоксилу при помощи карбодиимида

С-концевой карбоксил пептида активируется водорастворимым карбодиимидом и ковалентно связывается с аминополистиролом и аминопропилстеклом (а также с β-АПС).

Ранее проводили активацию пептидов, защищенных по N-концевой аминокислоте, в безводных щелочных условиях, используя ТЭТА-смолу и проводя реакцию при 40—50 °С [48]. В настоящее время используют незащищенные пептиды, а саму активацию проводят в более мягких условиях во избежании нежелательных реакций карбоксильных групп белковых цепей [3, 36, 49, 50, 72, 76]. Было найдено, что при использовании аминополистирола присоединение при pH 3—5 предпочтительнее конденсации в щелочных условиях. Напротив, носители на основе стекла лучше применять в безводных условиях [52, 60]. Кроме того, предложено совместное использование присоединения по карбоксильным группам пептида и по остаткам Lys [54, 55].

12.4.4.1. Достоинства, ограничения, методика присоединения.

Достоинства.

1. Присоединение по карбоксилу можно применять почти по всем типам пептидов, включая аргинил- и лизилсодержащие фрагменты триптических гидролизатов.

2. Конденсация в кислых условиях удобна во многих случаях, особенно тогда, когда лизилсодержащие пептиды нерастворимы в щелочных условиях, используемых в ДИТЦ-методе.

3. При наличии в пептиде внутренних остатков Lys с неизвестным расположением в цепи присоединение этого фрагмента по С-концу является предпочтительным.

4. Метод может быть использован для изучения аминокислотной последовательности на микроуровне.

Ограничения.

1. Для небольших пептидов конденсация проходит с выходом 40—70% [52]; при наличии С-концевого Lys выходы малы.

2. Пептиды, содержащие более 30 аминокислот, и белки часто присоединяются с выходами до 80—90%. Например, для брадикинина и В-цепи инсулина выходы составили 70—75 и ~60% соответственно [73]. В случае белков эффективность

конденсации может достичь 90%. Однако чем лучше идет присоединение белков к носителю, тем хуже они вступают в реакцию Эдмана (возможно, из-за стерических препятствий). Поэтому следует избегать количественного присоединения белка по всем СООН-группам. Мы нашли, что лучше всего, когда выход составляет 10—30% теоретического, с преимущественным присоединением по С-концевому карбоксилу. Однако для белков наилучшие результаты определения последовательности получены при использовании ДИТЦ-метода [37].

Методика 1. Присоединение к аминополистиролу.

Отмывка смолы. К 30—50 мг аминополистирола добавляют 1 мл буфера № 2 (разд. 12.2.5), суспензию перемешивают до появления фиолетовой окраски раствора. Смолу промывают водой (2 раза по 8 мл), ДМФА (2 раза по 1 мл), центрифугируют.

Присоединение. Высушивают раствор пептида в вакууме. Образец должен быть свободен от соли и органических кислот (например, уксусной, муравьиной). 5—50 нмоль пептида растворяют (под азотом) в 50 мкл буфера № 2. Отбирают пробу на проверку полноты растворения. Добавляют раствор пептида к предварительно отмытой смоле. Пробирку, содержащую пептид, ополаскивают 200 мкл ДМФА и добавляют промывки к реакционной смеси. Ополаскивание пробирки повторяют (100 мкл ДМФА). Добавляют под азотом свежеприготовленный раствор 2 мг карбодиимида в смеси 20 мкл воды и 80 мкл ДМФА. Перемешивают 60—120 мин при 30 °С (при работе с Glx- и Asx-содержащими пептидами время конденсации составляет 30—60 мин). Реакционную смесь центрифугируют; жидкость над осадком контролируют на содержание несвязанного пептида. Смолу промывают ДМФА, метанолом, буфером № 1 (2 раза по 200 мкл).

Насыщение свободных аминогрупп. Добавляют под азотом к пептидилполимеру 200 мкл буфера № 1, затем 200 мкл раствора № 1, содержащего ФИТЦ (разд. 12.2.6). Аккуратно перемешивают 30 мин при 30 °С. Смолу промывают ДМФА (2 раза по 200 мкл), метанолом (2 раза по 200 мкл), центрифугируют, сушат в вакууме.

Методика 2. Присоединение к аминопропилстеклу.

Подготовка пептида. 5—50 нмоль образца сушат в вакууме. Растворяют в 50—100 мкл безводной ТФУ, выдерживают под азотом при комнатной температуре в течение 15 мин. Немедленно сушат в вакууме над таблетками КОН (сушить не более 15 мин, более продолжительное высушивание может сделать образец нерастворимым).

Отмывка носителя. Носитель (взятый в соотношении 1 мг/нмоль пептида) промывают ДМФА (4 раза по 2 мл/50 мг стекла).

Присоединение. К высушенному пептиду приливают свежеприготовленный раствор карбодиимида (2 мг в 200 мкл ДМФА). Озвучивают смесь в течение 1 мин. Добавляют 50 мг аминопропилстекла и деаэрируют. Выдерживают под азотом (при аккуратном перемешивании) при 40 °С в течение 60 мин. Центрифугируют. Жидкость над осадком контролируют на содержание несвязанного пептида. Пептидилстекло промывают ДМФА и метанолом (2 раза по 200 мкл). Центрифугируют, сушат в вакууме.

12.4.5. Контроль степени присоединения

12.4.5.1. Проба на растворимость. Пептиды обычно проверяют на растворимость в буфере, используемом для присоединения. Пептид растворяют в буфере, отбирают аликвоту, содержащую 2 нмоль образца, высушивают

пробу в вакууме или сразу же наносят на пластинку ТСХ (целлюлоза Cell 300, фирма Macherey and Nagel). Хроматографируют в системе: пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 15 : 3 : 12, по объему). Опрыскивают пластинку раствором нингидрина в ацетоне (3 г на 100 мл). Должно проявиться только одно пятно с интенсивностью окрашивания, соответствующей 2 нмоль пептида. Если объем пробы превышает 2,5 мкл, то следует удалить соли лиофилизацией. При анализе структуры на микроуровне для экономии материала такой тест следует проводить более чувствительными методами, например методами ВЭЖХ или аминокислотного анализа.

12.4.5.2. Контроль степени присоединения. По окончании реакции конденсации жидкость над осадком проверяют на содержание остаточного (неприсоединенного) пептида. Отобранную пробу подвергают гидролизу и проводят аминокислотный анализ. При наличии пептида в растворе присоединение повторяют при других условиях. Если располагают достаточным количеством образца, то после обессоливания образец вновь используют в реакции конденсации.

Определение выхода в реакции присоединения. Порцию пептидилсмолы или стекла (10 мг) промывают ТФУ (2 раза по 0,5 мл) для удаления нековалентно связанного пептида, сушат в вакууме. Смолу смешивают с 250 мкл раствора состава: 12 М соляная кислота — пропионовая кислота (1 : 1), помещают в ампулы, вакуумируют и выдерживают в течение 24—48 ч при 110 °С [57] или 2 ч при 130 °С (в ампулах под азотом) [65]. Затем частицы смолы отделяют фильтрованием, отбрасывают, раствор упаривают, сухой остаток растворяют в цитратном буфере для аминокислотного анализа (pH 2,2). Проводят аминокислотный анализ и рассчитывают выход аминокислот. Гидролиз пептидилполимера можно проводить и в смеси 12 М соляная кислота — уксусная кислота — фенол (2 : 1 : 1) под вакуумом в течение 24 ч при 110 °С [20].

Пробные анализы на секвенаторе. Рабочий режим прибора и чистоту используемых реактивов и растворителей можно проверить, используя в качестве стандартных образцов брадикинин или В-цепь инсулина (в конденсацию вводят 10—100 нмоль образца) [78].

12.5. Отщепление на твердофазном секвенаторе

Конструкция прибора описана ранее [27—29, 35].

12.5.1. Колонка

Оба конца тонкой стеклянной трубки (длина 230 мм, внутренний диаметр 2,5 мм) полируют до получения ровной поверхности торца. Материалом соединений служит тефлон и кель F [27]. Колонку помещают в обогреваемый алюминиевый блок, термостатированный при 45 °С.

12.5.1.1. Микроколонка. Для анализа пептидов в количестве <20 нмоль используются колонки уменьшенного размера (например, 15×2 мм), заполненные шариками пептидилстекла, смешанными со стеклом-наполнителем. Известна конструкция колонки, сделанной из тефлоновой трубки (рис. 12.4), внутренний объем которой соответствует количеству используемого пептидилстекла. Под нижний суженный конец трубки помещен пористый тефлоновый фильтр (размер пор 2 мкм), лежащий в адапторе, закрывающем конец колонки. Мертвый объем вверху колонки уменьшен введением короткого отрезка узкой тефлоновой трубки. Колонка в сборке помещена в стеклянный термостат (рис. 12.6).

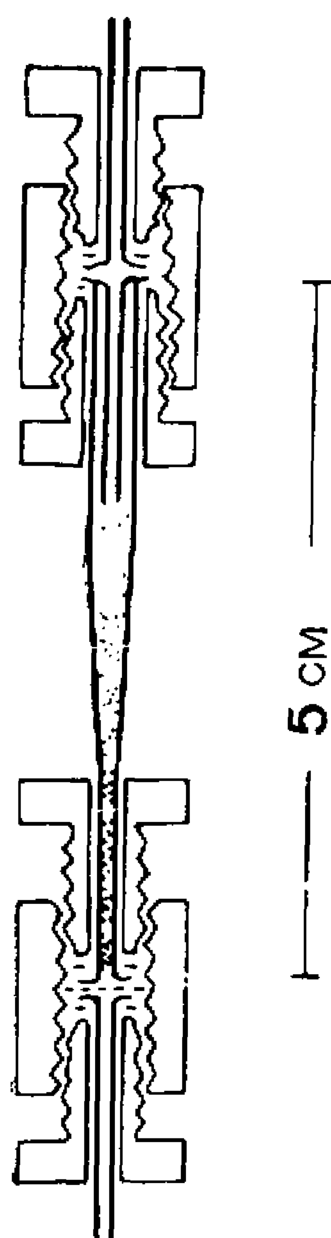


РИС. 12.4. Колонка для анализа пептидов на микроуровне. Материал колонки — тефлоновая трубка, внутренний объем которой зависит от количества используемого носителя. В верхнюю часть колонки введена узкая тефлоновая трубка, нижний конец колонки закрыт пористым тефлоновым фильтром с диаметром пор 2 мкм (фирма Zitex, Chemplast Inc.). Колонка помещена в термостатированную стеклянную трубку (см. рис. 12.1) [52, 69].

12.5.2. Упаковка колонки

В зависимости от размера колонки и количества пептидилполимера, последний смешивают с разными количествами стеклянных шариков (до 900 мг; разд. 12.2.3) и упаковывают колонку сухим способом [29]. Микроколонку заполняют пептидилполимером без разбавления стеклом, или же смолу помещают между двумя слоями инертных стеклянных шариков.

12.5.3. Программа работы секвенатора

Программы анализа различаются в зависимости от прибора, растворителей, и буферов, используемых на стадии присоединения ФИТЦ. Перед работой заполненную реакционную колонку и трубки подачи реагентов промывают всеми используемыми растворителями (например, метанолом и 1,2-дихлороэтаном). В двухколоночном варианте секвенатора анализ на первой колонке начинается с промывки ее метанолом, после чего проводится реакция конденсации (подачи буфера и раствора ФИТЦ). В это же время вторая колонка промывается 1,2-дихлороэтаном, затем следует промывка ТФУ. При необходимости вторую колонку можно использовать в качестве автоматического конвертора. Тиазолинон, поступивший на вторую колонку после первого цикла, превращают в ФТГ, проводя одновременно стадию карбамоилирования второго цикла на первой колонке (см. ниже). Программа микроанализа приведена на рис. 12.5, а ее вариант применительно к секвенатору фирмы LKB описан в табл. 12.2.

12.5.4. Реакция карбамоилирования

На этой стадии чаще всего используется буфер № 1 [27]. Недавно предложен безводный буфер на основе ДМФА (содержащий 2,5% триэтиламина или N-метилморфолина) [43, 60]. В анализе с использованием ДАБИТЦ — ФИТЦ хорошие результаты дает использование буфера № 3 (рис. 12.5). Безводные или содержащие ДМФА буферы предпочтительнее предлагавшихся ранее водных (поскольку безводная среда создает гидрофобное окружение пептида, присоединенного к полимеру). Эти буферы применимы как для полимерных, так и для стеклянных носителей.

Используется 5%-ный раствор ФИТЦ в ацетонитриле; для работы одновременно с ДАБИТЦ и ФИТЦ оба реагента растворяют в ДМФА (рис. 12.5), так как ДАБИТЦ меньше гидролизуется в этом растворителе.

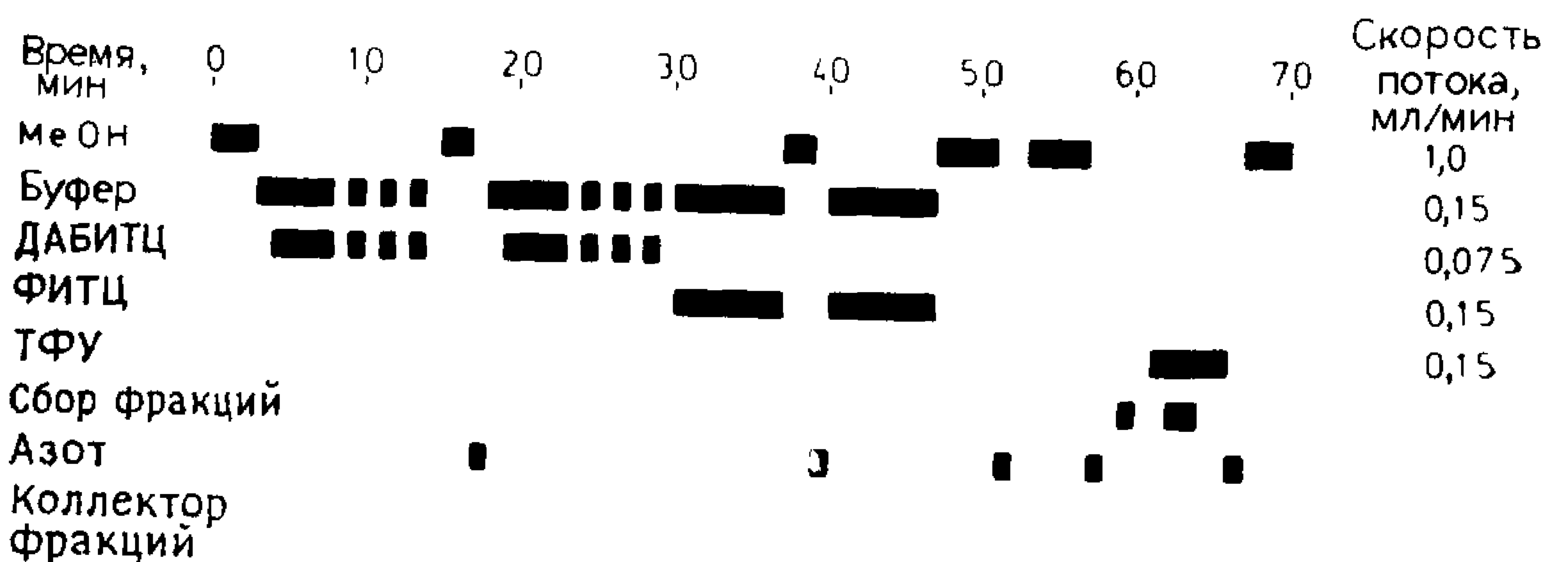


РИС. 12.5. Усовершенствованная программа для твердофазного анализа на микроуровне с использованием ДАБИТЦ — ФИТЦ. Обозначения: MeOH — метанол, содержащий 0,2% пропиламина; буфер — буфер № 3 для реакции карбамоилирования; ДАБИТЦ — 0,5%-ный раствор ДАБИТЦ в ДМФА; ФИТЦ — 5%-ный раствор ФИТЦ в ДМФА; ТФУ — безводная ТФУ [52].

12.5.5. Растворители

Для промывки колонки после взаимодействия с ФИТЦ обычно используют метанол и 1,2-дихлороэтан, который можно заменить бензолом. В одной из недавно предложенных программ для анализа на микроуровне используется только метанол [52]. Более высокие выходы получены в случае 0,2%-ного пропиламина в метаноле. При этом буфер добавляется порциями, между которыми колонка продувается азотом (рис. 12.5).

12.5.6. Отщепление анилинотиазолинона

В твердофазном методе для циклизации применяется ТФУ. Важное значение имеет время реакции отщепления, количество добавляемой кислоты: короткое время отщепления приводит к неполной циклизации, длительное — вызывает неспецифическое расщепление пептидных связей и рост загрязнения отщепленных тиазолинонов. Рекомендуется проводить циклизацию в течение 8 мин при 45 °С. Оптимальное время добавления кислоты можно определить, используя брадикинин, имеющий остатки пролина в положениях 2, 3 и 7. Время реакции считается достаточным, если в четвертом цикле отщепления содержится не более 10% остаточного пролина. Кроме того, выход третьего остатка пролина (седьмая N-концевая аминокислота) не должен резко упасть по сравнению с содержанием предыдущих остатков пролина. Отщепление при помощи ТФУ становится более эффективным, если перед добавлением кислоты колонку продуть азотом [43].

12.5.7. Перегруппировка анилинотиазолинона в ФТГ

12.5.7.1. Условия проведения процесса. Отщепленные анилинотиазолиноны (АТЗ) превращают в ФТГ аминокислот в водных растворах кислот или в безводном растворе хлороводорода. Используют следующие среды и условия превращения:

1) 1 М соляная кислота, 10—15 мин, 80 °С [14];
2) 20%-ная ТФУ, 10 мин, 80 °С [27];
3) 20%-ная ТФУ, 20—30 мин, 55 °С [72];
4) 30—40%-ная ТФУ, 45—65 мин, 49—50 °С [52];

Таблица 12.2. Модификация секвенатора (модель 4020, фирма LKB) для работы по методике ДАБИТЦ — ФИТЦ

Твердофазный стандартный секвенатор (модель 4020) модифицирован для работы на микроуровне [52]. Программа работы прибора показана на рис. 12.5. Модификация включала следующие изменения конструкции прибора:

1) введена линия продувки азотом (см. рис. 12.6) для высушивания колонки прибора на стадиях карбамоилирования, отщепления, промывки растворителями;

2) стандартная колонка фирмы LKB заменена тефлоновой микроколонкой (см. рис. 12.4), погруженной в стеклянный термостат, прогретый до 50 °С;

3) колонка № 2 используется в качестве конвертора (30%-ная ТФУ, 65 мин, 50 °С; превращение в автоматическом режиме). Вместо стандартной колонки применяется тефлоновая спираль (1,5×400 мм), в которую с колонки № 1 поступает раствор тиазолинона в ТФУ. Одновременно в ту же линию подается вода, смешивающаяся с раствором тиазолинона [4];

4) все соединительные линии уменьшены в диаметре и укорочены по мере возможности.

---

5) 1 М хлороводород в метаноле (полученный добавлением 1—2 М хлороацетила к метанолу при охлаждении на льду), 5—10 мин при 55 °С [23, 58].

6) 2,4 М метиламин в изопропаноле (или газообразный метиламин) предложены для превращения в метиламиды фенилтиокарбамоиламинокислоты [1].

Оптимальные условия количественного превращения тиазолинонов отдельных аминокислот в ФТГ сильно отличаются друг от друга. Gly и Lys превращаются с наименьшими скоростями, тогда как Ser и Thr не только быстро переходят в ФТГ этих же аминокислот, но и претерпевают частичную деструкцию. Поэтому в общем случае методика реакции превращения АТЗ в ФТГ должна компромиссно учитывать эти крайние условия с присущими им недостатками. При анализе дорогостоящих пептидов желательна специальная обработка отщепленных производных в каждом цикле. Превращение в соляной кислоте предпочтительнее обработки ТФУ в случае Ser и Thr. При работе с ФТГ-производными Gln и Asn лучше использовать водную ТФУ, так как в этом случае возможно быстрое упаривание разбавленного раствора после завершения реакции, что уменьшает до минимума дезамидирования ФТГ этих аминокислот. В то же время применение разбавленной соляной кислоты ведет к почти полному дезамидированию Gln и Asn, что не позволяет надежно определять присутствие амидов.

Проведение реакции в безводном хлороводороде имеет некоторые преимущества перед водными средами (более мягкие условия, большая летучесть реагента). Недостаток методики связан с тем, что могут этерифицироваться боковые цепи Asp и Glu. При неполной этерификации после проведения конверсии

в реакционной среде присутствуют два вида производных (ФТГ-Asp и ФТГ-CH_3O-Asp). Аналогичная картина наблюдается в случае ФТГ-производного Glu. Полнота протекания реакции зависит от устойчивости раствора хлороводорода в метаноле, которая низка при высоких температурах; поэтому всегда следует использовать свежеприготовленные растворы.

12.5.7.2. Ручная конверсия. В твердофазных секвенаторах отщепленные тиазолиноны аминокислот элюируются в пробирки коллектора фракций в растворе, содержащем 1,5 мл ТФУ и 3 мл метанола. При ручном превращении АТЗ хранят в этой смеси в течение ночи при комнатной температуре. Однако АТЗ чувствительны к кислороду, поэтому происходит частичное разрушение производных некоторых аминокислот (например, Ser, Thr, Arg, His). Кроме того, если после обработки ТФУ колонка промывается метанолом, то Asp и Glu частично превращаются в соответствующие метиловые эфиры. Для предотвращения этого рекомендуется после проведения реакции колонку промывать сначала 1,2-дихлороэтаном или ДМФА. Для увеличения выхода ФТГ-производных Ser и Thr раствор АТЗ разбавляют водой, как указано ниже.

Перед началом анализа в каждую пробирку коллектора фракций наливают 3—7 мл воды, на следующий день содержимое пробирок упаривают на роторном испарителе или на вакуумном концентраторе и проводят конверсию.

Методика превращения. В потоке азота добавляют 0,3 мл 20%-ной водной ТФУ, выдерживают 30 мин при 55 °С. Упаривают раствор в вакууме. Для удаления летучих побочных продуктов остаток выдерживают в вакууме (масляный насос, до 5 ч). Растворяют содержимое пробирки в метаноле и идентифицируют ФТГ-производные аминокислоты методами ГЖХ, ТСХ, ВЭЖХ. Для упрощения методики предложено использовать обогреваемый эксикатор как для упаривания растворителей, так и для проведения конверсии.

12.5.7.3. Автоматическая конверсия. Описаны устройства, позволяющие проводить в атмосфере азота быстрое превращение АТЗ неустойчивых аминокислот в их относительно устойчивые ФТГ-производные. При этом налицо следующие преимущества: меньшая степень разрушения ФТГ, т. е. незначительное содержание побочных продуктов, меньшее (в зависимости от использованной среды) деамидирование Asn и Gln, повышение выходов ФТГ-Ser и ФТГ-Thr, сокращение времени процесса. Первый конвертор был выполнен в виде термостатированного при 55 °С стеклянного сосуда (колбы) с двойными стенками; кислый раствор упаривался в токе азота [66, 75]. Описан конвертор в виде реактора с рубашкой [7]. В другом устройстве используется реакционная спираль, через которую проходит поток раствора

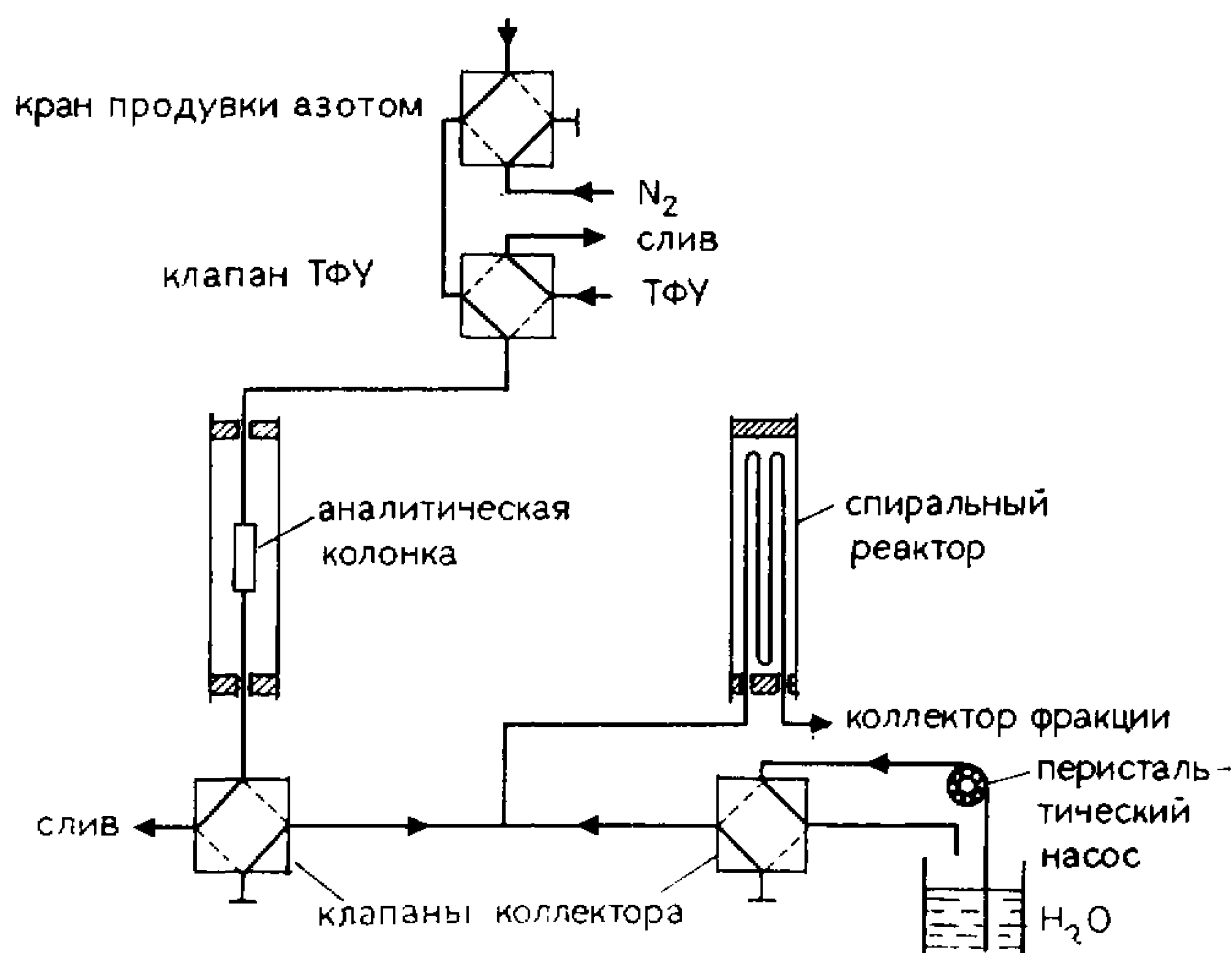


РИС. 12.6. Схема модифицированного секвенатора для твердофазного анализа фирмы LKB (модель 4020), имеющего продувку колонки азотом и автоматический конвертор [52].

с секвенатора; в поток добавляется необходимое количество воды; конверсия проводится при 80 °С [4]. В этом случае образующиеся ФТГ-производные аминокислот хранят в кислом растворе. Коммерчески доступен автоматический конвертор, схожий с конвертором-колбой (Sequemat P-6 Auto Convertor; подробное описание см. в работе [23]). Этот конвертор можно присоединить и к жидкофазному, и к твердофазному секвенатору, причем сообщалось, что при его использовании количественно образуются метиловые эфиры Asp и Glu кислот, отсутствуют свободные кислоты, не наблюдается деамидирования Asn и Gln. Однако при использовании обычного коммерческого конвертора в указанных условиях превращения образуется неединственное производное и затруднен количественный анализ. Недавно стал доступен недорогой и несложный вариант модификации секвенатора фирмы LKB (в качестве конвертора служит вторая колонка прибора [52]). В общем случае конверсия проводится по методике, описанной в работе [4], с использованием 30%-ной водной ТФУ при 50 °С продолжается ~60 мин по программе, разработанной для микроанализа с ДАБИТЦ—ФИТЦ (рис. 12.6 и табл. 12.2).

12.5.7.4. Идентификация с использованием ВЭЖХ в режиме прямой стыковки секвенатора с хроматографом («on line»). В идеале автоматический анализ аминокислотной последова-

тельности полипептидов требует и автоматического превращения АТЗ; это обстоятельство становится необходимым предварительным условием анализа исчезающе малых количеств пептидов. Разработки ближайшего времени будут включать в себя автоматическую регистрацию результатов определения путем идентификации отщепленных ФТГ-производных аминокислот в режиме непрерывной работы с секвенатором, например при помощи ВЭЖХ. Первый вариант такой непрерывной системы («on line») был предложен применительно к твердофазному секвенатору [38, 39]. Эта система была разработана для секвенатора, в который отщепленные ФТГ-производные растворены в смеси органического растворителя, ТФУ, воды. Сначала удаляли кислоту, затем образец дозировали в колонку жидкостного хроматографа.

При использовании конверторов (например, конвертор Wittmann-Liebold [75]), обеспечивающих удаление кислоты, монтаж системы автоматической идентификации методом ВЭЖХ прост: проба раствора, содержащего тиогидантоин, при помощи автоматического клапана дозируется на колонку ВЭЖХ [69]. Использовали изократическую хроматографию тиогидантоинов на колонке RP_8 (диаметр зерна сорбента 3 мкм, размер колонки 4×250 мм) при 61 °C. Элюирование проводилось в системе: 19,5%-ный изопропанол+1%-ный ТГФ+1,5% 10 мМ ацетата натрия (pH 5,3) в режиме рецикла. На колонку дозировалось 25—50% объема образца [70]. Остаток образца высушивался в коллекторе фракций и использовался для дополнительной идентификации в градиентной системе ВЭЖХ. Изократическое элюирование в системе «on line» проще, чем градиентное. Оно позволяет контролировать ход отщепления и состояние прибора. При этом достигается полное разделение всех производных аминокислот. Наш опыт показывает, что при автоматической идентификации в режиме «on line» хранение части полученных ФТГ-производных аминокислот необходимо как мера предосторожности на случай поломки хроматографа или для последующей идентификации модифицированных аминокислот.

12.6. Обсуждение

12.6.1. Твердофазный анализ небольших пептидов

Методы твердофазного анализа применимы почти ко всем типам пептидов. Они разработаны для пептидов, содержащих до 30 аминокислотных остатков, но могут быть использованы для анализа и более крупных пептидов и белков. Обязательные стадии включают: 1) присоединение пептидов через α- и ε-аминогруппы к носителям на основе полистирола или стекла путем

активации *п*-фенилендиизотиоцианатом и 2) присоединение через С-концевую карбоксильную группу активацией водорастворимыми карбодиимидами. Наиболее полезными носителями оказались аминополистирол и 3-аминопропилстекло. При использовании носителей на основе стекол в продуктах отщепления присутствует меньше примесей, поэтому в последние годы они стали предпочтительными. Выход на стадии присоединения к носителям составляет 60—90% и зависит от метода конденсации, качества носителя и умения подобрать условия растворения образца для присоединения. Помимо конденсации при помощи двух указанных методов, можно с высоким выходом присоединять пептиды через лактон гомосерина к ТЭТА-полистиролу, 3-аминопропилстеклу и β-N-аминоэтил(3-аминопропил)стеклу. При работе с ТЭТА-полистиролом необходимы тщательное соблюдение условий синтеза самого ТЭТА-полимера, промывка носителя перед использованием и хранение его под азотом. Были предложены носители других типов, например полимеры на основе поли-N-алкилакриламида [2, 10] или макропористых производных полистирола [26]. Но до сих пор эти смолы не нашли широкого применения для изучения структуры полипептидов, высушенных из биологических источников. С новыми подходами в создании носителей можно ознакомиться в главе 16.

12.6.2. Твердофазный анализ крупных пептидов и белков

Для этой цели наиболее предпочтительны носители на основе стекла. Методика состоит в присоединении активированных лизилсодержащих пептидов, тогда как фрагменты, не содержащие такие группы или содержащие главным образом Arg, присоединяются труднее. Общий метод конденсации больших фрагментов, не содержащих Lys, состоит в присоединении по С-концевой аминокислоте при помощи карбодиимидов. Присоединение белков к аминополистиролу проходит с очень малым выходом, но при замене его на АПС или β-АПС выходы увеличиваются до 20—60%. Следует контролировать не только степень присоединения, но и саму возможность анализа последовательности аминокислот, полученных пептидилполимеров. Опыт показывает, что, несмотря на отличный выход в конденсации белка с носителем, нерастворяющиеся «пришитые» белки могут давать плохие выходы N-концевых аминокислотных остатков. Опыт показывает, что твердофазный анализ последовательности белков на микроуровне лучше всего проводить после присоединения белка через ε-NH_2-группы.

12.6.3. Сравнение жидкофазного и твердофазного методов

При выборе методов установления аминокислотной последовательности полипептидов предпочтительность метода зависит от свойств пептида или белка (растворимость, аминокислотный состав, длина цепи). Выбор метода анализа обусловлен также доступностью изучаемого материала и чувствительностью определения отщепленных производных.

Достоинства твердофазного метода

1) Относительно низкая стоимость секвенатора и простота обслуживания механической части прибора.

2) Дешевизна реагентов и растворителей.

3) Пептид, ковалентно связанный с носителем, не вымывается растворителем при промывках колонки.

4) Наличие ДСН не влияет на процесс присоединения белка к носителю [63].

Недостатки метода заключаются главным образом в неполном присоединении полипептида к носителю и иногда в частичном разрушении самого носителя, которое существенно увеличивается по мере проведения процесса определения. Более детальное сравнение методик автоматического анализа структуры можно найти в работах [67, 68].

12.6.4. Анализ структуры на микроуровне

С появлением ВЭЖХ и высокочувствительных проточных детекторов стал возможным анализ на микроуровне с идентификацией пикомольных количеств вещества. Чувствительность микроанализа ограничивается чистотой производных, их стабильностью в ходе и после отщепления, наличием примесей. Обязательное условие — высокая чистота растворителей; для устранения возможности загрязнения секвенатор, во-первых, должен иметь минимальные «мертвые» объемы и некорродирующие клапаны и соединения, во-вторых, необходимо постоянно поддерживать на высоком уровне технические параметры прибора. Лимитирующими факторами в жидкофазном анализе является качество полибрена, в твердофазном — качество носителей. Дополнительно осложняет анализ существенное различие выходов отдельных производных. Некоторые тиогидантоины отщепляются с высокими выходами и устойчивы, другие присутствуют в малых количествах, так как они либо плохо отщепляются, либо разрушаются после отщепления; в любом случае их трудно обнаружить на фоне побочных продуктов. Следует тщательно контролировать техническое состояние прибора для того, чтобы быть уверенным в результатах тех анализов, где

существует риск подавления полезных сигналов шумами, хотя бы и сведенными к минимуму. Работоспособность самого прибора можно проверить проведением холостого опыта (без пептида или белка). Фракции, полученные с каждого цикла опытов, следует проверять на наличие загрязнений, используя для анализа большие аликвоты фракции. Для построения градуировочного графика прибора выполняют контрольные анализы на стандартных образцах пептидов или белков. Следует отметить, что методы выделения, используемые для очистки пептидов и белков, сильно влияют на растворимость объектов, т. е. они имеют большое значение при оценке самой возможности анализа их структуры методом Эдмана. Следы солей буферов (например, ацетат аммония) или аминов снижают эффективность отщепления ФТГ-производных аминокислот и вызывают частичное блокирование N-концевых аминокислот пептидов. Это обстоятельство оказывается решающим при анализе очень малых количеств пептидов; для предотвращения необратимого блокирования N-концевых аминокислот выделение пептидов (белков) следует проводить в восстанавливающих условиях.

12.6.4.1. Отщепление по Эдману с применением меченого реагента. В литературе описано несколько методик, использование которых может существенно снизить расход образца. В одной из таких методик применяется радиоактивно меченный ФИТЦ [6, 8, 9, 27]. Следует работать только с чистым реагентом, так как примеси, присутствующие в исходном ФИТЦ, а также образующиеся в ходе отщепления, делают идентификацию ФТГ-производных аминокислот ненадежной. Уровень радиоактивного фона зависит также от того, насколько плотно подтянуты уплотнения клапанов и резьбовые соединения. Гораздо чище проходит анализ структуры пептидов и белков, меченных in vivo. Трудности, связанные с использованием метки в белках или реагентах, обсуждаются в работе [44].

12.6.4.2. Анализ с использованием ДАБИТЦ. Описан эффективный подход к ручному определению последовательности на микроуровне, при котором ФИТЦ заменен его аналогом 4-N,N-диметиламиноазобензолизотиоцианатом (ДАБИТЦ) [12]. Метод очень чувствителен — производные аминокислот можно легко идентифицировать на пикомольном уровне при помощи ТСХ и анализировать количественно методом ВЭЖХ [13, 37]. Подробно методики изложены в гл. 14. Для твердофазного анализа на микроуровне разработан метод совместного использования ФИТЦ и ДАБИТЦ [25]. Недавно предложен улучшенный вариант этого метода, дающий однозначные результаты при работе с очень малыми количествами образца [52].

Благодарности. Я благодарю А. Лехмана за содействие в подготовке этой главы, а также К. Ашман и П. Ролинга за предварительное ознакомление с материалом после перевода его на английский язык.

Литература

1. *Apella E., Inman J. K., Dubois G. C.*, See [47], pp. 121—133.
2. *Atherton E., Clive D. L. J., Sheppard R. C.*, J. Am. Chem. Soc., **97**, 6584—6585 (1975).
3. *Beyreuther K.*, See [47], pp. 107—114.
4. *Birr C.*, See [29], pp. 115—129 (1975).
5. *Birr C.* (Ed.), Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, Proc. Third Internat. Conf., Elsevier/North Holland, Heidelberg, Amsterdam, New York, Oxford (1980).
6. *Bridgen J.*, FEBS Lett., **50**, 159—162 (1975).
7. *Bridgen J.*, Methods Enzymol., **47**, pp. 385—391 (1977)
8. *Bridgen J.*, Methods Enzymol., **47**, pp. 321—335 (1977).
9. *Bridgen J., Waxdal M. J.*, See [47], pp. 153—162.
10. *Cavadore J. C., Derancourt J., Previero A.*, FEBS Lett., **66**, 155—157 (1976).
11. *Chang J. Y.*, Biochem. Biophys. Acta, **578**, 188—195 (1979).
12. *Chang J. Y., Brauer D., Wittmann-Liebold B.*, FEBS Lett., **93**, 205—214 (1978).
13. *Chang J. Y., Lehmann A., Wittmann-Liebold B.*, Anal. Biochem., **102**, 380—383 (1980).
14. *Edman P.*, Acta Chem. Scand., **4**, 238—293 (1950).
15. *Edman P., Begg G.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80—91 (1967).
16. *Elzinga M.* (Ed.), Methods in Protein Sequence Analysis, Proc, Fourth Internat Conf., Humana Press, Clifton N. J. (1982).
17. *Frank R.*, Doctoral Thesis, Ruprecht-Karl-Universität, Heidelberg, (1979).
18. *Gisin B. F.*, Analyt. Chim. Acta, **58**, 248—249 (1972).
19. *Gray W. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 379—380 (1963).
20. *Gutte B., Merrifield R. B.*, J. Biol. Chem., **246**, 1922—1941 (1971).
21. *Herbrink P., Tesser G. I., Lamberts J. J. M.*, FEBS Lett., **60**, 313—316 (1975).
22. *Hewick R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W. J.*, J. Biol. Chem., **15**, 7990—8005 (1981).
23. *Horn M. J., Bonner A. G.*, See [47], pp. 163—176.
24. *Horn M. J., Laursen R. A.*, FEBS Lett., **36**, 285—288 (1973).
25. *Hughes G. J., Winterhalter H., Lutz H., Wilson K. H.*, FEBS Lett., **108**, 92—97 (1979).
26. *Inman J. K., Dubois G. C., Apella E.*, See [47], pp. 81—94.
27. *Laursen R. A.*, Eur. J. Biochem., **20**, 89—102 (1971).
28. *Laursen R. A.*, Methods Enzymol., **25**, 344—359 (1972).
29. *Laursen R. A.* (Ed.), Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. First Internat. Conf., Peirce, Rockford, Illinois (1975).
30. *Laursen R. A.*, In Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, Peptides, Weetall H. H. (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 567—634 (1975).
31. *Laursen R. A.*, See [29], pp. 3—9.
32. *Laursen R. A.*, See [47], pp. 95—106.
33. *Laursen R. A.*, Methods Enzymol., **47**, pp. 277—288 (1977).
34. *Laursen R. A., Horn M. J., Bonner A. G.*, FEBS Lett., **21**, 67—70 (1972).
35. *Laursen R. A., Bonner A. G., Horn M. J.*, See [46], pp. 173—110.
36. *Laursen R. A., Obar R., Chin F., Whitrock K.*, See [5], pp. 9—20.
37. *Lehmann A., Wittmann-Liebold B.*, FEBS Lett., **176**, 360—364 (1984).
38. *Machleidt W., Hofner H.*, See [5], pp. 35—47.

39. *Machleidt W., Hofner H.*, In: High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry, Lottspeich F., Henschen A., Hupe K. P. (Eds.), Walter de Gruyter Verlag, Berlin, pp. 245—258 (1981).
40. *Machleidt W., Machleid I.*, See [47], pp. 233—246.
41. *Machleidt W., Wachter E.*, Methods Enzymol., **47**, 263—277 (1977).
42. *Machleidt W., Wachter E., Scheulen M., Otto J.*, FEBS Lett., **37**, 217 (1973).
43. *Machleidt W., Hofner H., Wachter E.*, See [29], pp. 17—30.
44. *McKean D. J.*, See [5], pp. 143—152.
45. *Morris H. R., Dickinson R. J., Williams D. H.*, Biochem. Biophys. Res, Commun., **51**, 247—255 (1973).
46. *Perham R. N.* (Ed.), Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis, Academic Press, London, New York, San Francisco (1975).
47. *Previero A., Coletti-Previero M.-A.* (Eds.), Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Second Internat. Conf., North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1977.
48. *Previero A., Derancourt J., Coletti-Previero M.-A., Laursen R. A.*, FEBS Lett., **33**, 135—138 (1973).
49. *Reinbolt J., Tritsch D., Wittmann-Liebold B.*, See [47], pp. 209—218.
50. *Reinbolt J., Tritsch D., Wittmann-Liebold B.*, Biochimie, **61**, 501—502 (1979).
51. *Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D.*, Biochem. Biophys. Acta, **242**, 659—661 (1971).
52 *Salnikow J., Lehmann A., Wittmann-Liebold B.*, Anal. Biochem., **117**, 433—442 (1981).
53 *Salnikow J., Lehmann A., Wittmann-Liebold B.*, See [16], pp. 181—188.
54. *Schiltz E.*, See [47], pp. 247—256.
55. *Schiltz E., Reinbolt J.*, Eur. J. Biochem., **56**, 467—481 (1975).
56. *Schmitt H. W., Walker J. E.*, FEBS Lett., **81**, 403—405 (1977).
57. *Scotchler J., Lozier R., Robinson A. B.*, J. Org. Chem., **35**, 3151 (1970).
58. *Tarr G. E.*, Anal. Biochem., **63**, 361—370 (1975).
59. *Terhorst C., Möller W., Laursen R. A., Wittmann-Liebold B.*, Eur. J. Biochem., **34**, 138—152 (1973).
60. *Wachter E., Werhahn R.*, Anal. Biochem., **97**, 56—64 (1979).
61. *Wachter E., Machleidt W., Hofner H., Otto J.*, FEBS Lett., **35**, 97 (1973).
62. *Wachter E., Hofner H., Machleidt W.*, See [29], pp. 31—46.
63. *Walker J. E., Auffret A. D., Carne A., Gurnett A., Hanisch P., Hill D., Saraste M.*, Eur. J. Biochem., **123**, 253—260 (1982).
64. *Waterfield M. D., Bridgen J.*, See [46], pp. 41—71.
65. *Westall F. C., Scotchler J., Robinson A. B.*, J. Org. Chem., **37**, 3363 (1972).
66. *Wittmann-Liebold B.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 1415—1431 (1973).
67. *Wittmann-Liebold B.*, In Polypeptide Hormones, Beers R. F. J., Bassett E. G. (Eds.), Raven Press, New York, pp. 87—120 (1980).
68. *Wittmann-Liebold B.*, In: Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins, Liu T.-Y., Schechter A. N., Heinrikson R. L., Condliffe P. G. (Eds.), Elsevier/North Holland, New York, pp. 75—110 (1981).
69. *Wittmann-Liebold B.*, See [16], pp. 27—63.
70. *Wittmann-Liebold B., Ashman K.*, In Modern Methods in Protein Chemistry, 2, Tschesche H. (Ed.), Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 303 (1985).
71. *Wittmann-Liebold B., Kihura M.*, In: Methods in Molecular Biology. 1, Walker J. M. (Ed.), Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 221—242 (1984).
72. *Wittmann-Liebold B., Lehmann A.*, See [29], pp. 81—90.
73. *Wittmann-Liebold B., Lehmann A.*, See [5], pp. 49—72.
74. *Wittmann-Liebold B., Geissler A.-W., Marzinzig E.*, J. Supramol. Struct., **3**, 426—447 (1975).
75. *Wittmann-Liebold B., Graffunder H., Kohis H.*, Anal. Biochem., **75**, 621—633 (1976).
76. *Wittmann-Liebold B., Brauer D., Dognin J. M.*, See [47], pp. 219—232.

Глава 13

АНАЛИЗ ФЕНИЛТИОГИДАНТОИНОВ АМИНОКИСЛОТ

М. Д. УОТЕРФИЛД, Дж. СКРЕЙК, Н. ТОТТИ
(M. D. WATTERFIELD, G. SCRACE, N. TOTTY,
Protein Chemistry Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, U.K.)

13.1. Введение

Отщепление по Эдману при помощи ФИТЦ — наиболее распространенный и надежный метод определения аминокислотной последовательности пептидов и белков. В настоящее время в анализе и больших, и малых пептидов используют ручной и автоматический методы; при этом в большинстве случаев идентификацию отщепленных аминокислот проводят в виде их ФТГ-производных. Анализу последних посвящено множество статей. В этой главе рассматривается пять основных методов анализа ФТГ-производных аминокислот.

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), использованный Эдманом и Бэггом и описанный в их классической работе, посвященной автоматическому секвенатору [2], наиболее прост в экспериментальном отношении, не требует дорогого оборудования, но характеризуется невысокой чувствительностью (~1 нмоль). ТСХ удобна как для ручного, так и для автоматического определения последовательности; однако это скорее качественный, чем количественный метод. Как бесспорное достоинство метода надо отметить возможность одновременного анализа нескольких образцов. Метод можно сделать полуколичественным, элюируя ФТГ с хроматографической пластинки, но обычно это не делается. При идентификации ФТГ-Arg и ФТГ-His ТСХ следует дополнять другими методами — ВЭЖХ тех же ФТГ-аминокислот, или аминокислотным анализом свободных аминокислот, полученных при обратном гидролизе ФТГ-аминокислот. Следует проводить обратный гидролиз при анализе только коротких пептидов и высокоэффективном определении последовательности аминокислот средних пептидов на секвенаторе с использованием наномольных количеств образца. Для анализа ФТГ-производных аминокислот с середины 60-х годов стала использоваться газожидкостная хроматография (ГЖХ). Этим методом можно быстро и количественно определить большинство, но не все ФТГ-производные аминокислот. В неспособности ГЖХ обеспечить однозначную идентификацию ФТГ-производных всех 20 аминокислот заклю-

чается главный недостаток метода. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) позволяет быстро разделить и количественно идентифицировать ФТГ-производные всех 20 аминокислот на пикомольном уровне. Отметим еще один метод, используемый лишь в некоторых лабораториях. Это масс-спектрометрия; метод характеризуется наивысшей чувствительностью, но требует сложного оборудования, доступного лишь немногим лабораториям.

При выборе метода анализа надо четко учитывать цену и доступность оборудования, а также реальную чувствительность, необходимую для работы. В настоящее время предпочитают ВЭЖХ, особенно для высокочувствительных определений. В данной главе рассматривается главным образом этот аспект ее применения.

13.2. Аналитические методы

13.2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

В конце 70-х — начале 80-х годов происходил взрывообразный рост числа публикаций по ВЭЖХ ФТГ-производных аминокислот, причем в разных лабораториях работали на разных приборах, колонках и применяли разные буферы. Поэтому новичку трудно сделать правильный выбор условий разделения. В этом разделе описываются те системы, относительно которых мы имеем личный опыт. Замечания и оговорки, относящиеся к этим и другим системам, помогут читателю сделать выбор хроматографической системы.

13.2.1.1. Оборудование. Большое число коммерческих моделей хроматографов доступно либо в виде набора модулей, либо в виде моноблоков. Часто можно собрать хроматограф из модулей, производимых разными фирмами. Это позволяет соблюсти разумный компромисс между ценой и качеством прибора, но неопытному аналитику не следует выбирать такой вариант. Основные требования к аналитической системе вкратце можно сформулировать следующим образом:

1) Система подачи растворителей должна обеспечивать возможность создания линейных градиентов при скоростях потока 0,1—2,75 мл/мин и при давлениях 0,3—35,0 МПа. Эффективность колонки повышается при уменьшении размера частиц; при этом возрастает рабочее давление (при сохранении длины колонки) и поэтому разумно предусмотреть возможность работы при больших давлениях. Растворители, используемые для градиентного элюирования, можно предварительно смешивать и подавать на колонку с помощью одного насоса (как прави-

ло, имеющего несколько головок). В то же время описаны системы, включающие несколько насосов, каждый из которых подает свой растворитель в смесительную камеру. В обоих случаях для создания градиента требуется электронное программирующее устройство; часто форма градиента выбирается из набора готовых форм разной крутизны. Следует отметить, что добиться хорошей воспроизводимости разделения ФТГ-производных аминокислот при ВЭЖХ довольно трудно; важную роль при этом отводят подбору градиентов. Эффективность системы легко оценить, выполнив несколько разделений в одних и тех же условиях. Следует предусмотреть возможность задания и поддержания изократического режима разделения на разных участках анализа, особенно в конце градиентного разделения. С помощью электронного программирующего устройства система в конце каждого аналитического цикла возвращается в исходное состояние. Используя систему, состоящую из водного буфера *A* и органического растворителя *B**, надо иметь возможность на короткое время между анализами увеличивать содержание компонента *B* в элюенте до 100% (для C_8-колонок см. разд. 13.2.1.5); это позволяет хорошо промыть колонку, а также способствует продлению срока службы колонки. Как и во всех хроматографических аналитических методах, колонка как средство разделения играет решающую роль в создании высокого разрешения. При наличии эффективной колонки нет необходимости в программировании скорости потока или в создании сложных форм градиентов с промежуточными изократическими участками. Однако полезно иметь такие возможности для того, чтобы при необходимости использовать их.

2) Необходимо иметь инжектор, позволяющий наносить образец на колонку без сброса давления и соответственно без изменения скорости потока. При помощи инжектора на колонку наносят от одного до нескольких сотен микролитров раствора образца с точностью $\pm 1\%$. Многие операторы быстро осознают преимущества автоматических инжекторов, оправдывающие высокую стоимость этих модулей.

3) Для оптимизации разделения по температуре термостат колонки должен контролировать температуру в диапазоне 20—65°C.

4) Поглощение элюата записывают на длине волны 254 нм в кюветах малого объема (10 мкл и менее) при давлениях в кювете до 3,5 атм. Полезно использовать второй канал детектирования (при 313 нм) для регистрации модифицированных производных Ser, Thr, образующихся в ходе автоматического

* Обычно это чистый органический растворитель (ацетонитрил, метанол и т. д.). — *Прим. перев.*

анализа последовательности. Конструкции проточных ячеек некоторых фирм позволяют свести к минимуму влияние изменения коэффициента преломления, происходящего при градиентном элюировании. По мере увеличения разрешающей способности колонки возрастает скорость анализа. При уменьшении диаметра колонки сокращается время пребывания элюируемых компонентов в проточной ячейке, поэтому для проведения скоростных анализов необходимо использовать детекторы, способные работать при малых значениях постоянной времени детектора. Рабочая чувствительность лучших (спектро)фотометров составляет 0,001 ед. опт. плотн. на всю шкалу при удовлетворительном отношении сигнала к шуму.

При использовании 1,0—0,01 нмоль пептида диапазон до 0,005 ед. опт. плотн. является достаточным, но при работе с меньшими количествами необходим более чувствительный детектор. При работе на микроуровне необходима оптимизация всех элементов прибора и параметров разделения; необходимы растворители высокой чистоты, потому что резко возрастает дрейф базовой линии в ходе высокочувствительного элюирования. Может понадобиться дополнительная очистка растворителей, буферов, воды.

5) Для регистрации результатов разделения необходима система записи данных идентификации ФТГ-производных аминокислот. Существует несколько типов интеграторов, обладающих разными возможностями. В большинстве случаев перед разделением продуктов отщепления проводят градуировку по методу внешних стандартов, что позволяет оценить удельные площади пиков (в наномолях) и ширину «окна» для идентификации пиков. Интеграторы могут обрабатывать базовую линию сложного вида и находить площади неразделенных пиков. Чтобы получить достоверные результаты при расчетах площадей пиков разной формы, для разных участков хроматограммы используются различные значения ширины пиков и уровня шумов. Эксплуатация хроматографов на пикомольном уровне часто соответствует пределу рабочих параметров, поэтому необходимо иметь прибор с большим запасом возможностей. В настоящее время существуют дешевые одноканальные интеграторы, записывающие результаты измерений на термочувствительную бумагу. Некоторые интеграторы можно соединять с компьютерами для хранения исходных или предварительно обработанных данных, поступающих с детектора непосредственно в компьютер. Можно использовать интерфейс на основе 12—16-разрядного аналого-цифрового преобразователя (АЦП) или применять стандартный интерфейс (например IEEE, RS232 или 16-разрядный интерфейс общего назначения). В этом случае нужна относительно низкая скорость записи хроматографиче-

ских данных (10—25 точек/с); необходимо приобрести или составить самостоятельно программу интегрирования для данного компьютера. После сбора данных компьютер может проводить сглаживание сигнала и вычитание базовой линии для улучшения соотношения сигнал/шум.

В исследованиях, результаты которых излагаются в данной главе, использовалась система фирмы Waters, состоящая из автоинжектора WISP (модель 710В), двух насосов (модель 6000), детектора (модель 440, длины волн 254 и 313 нм), колонки с водяным термостатом. Для работы на шкале 0,002 и 0,001 ед. опт. плотн. применяют детектор фирмы Altex (модель 160) с автоматической установкой исходной базовой линии после проведения каждого анализа. Выход сигнала (шкала на 10 мВ) присоединен к системе обработки данных (модель 730 фирмы Waters). Насосы управляются с помощью программирующего устройства (модель 720 фирмы Waters). Для записи и обработки данных используется система, описанная выше. Для прямого сбора данных детектор соединен с АЦП, который через HPIB имеет выход на компьютер (модель 9845/204 фирмы Hewlett-Packard). В последнее время применяют также многоканальную систему фирмы Nelson Analytical в комбинации с компьютером фирмы Hewlett-Packard (модель 9816).

13.2.1.2. Хроматографические растворители. Наиболее важное значение имеет оптическая чистота воды, растворов солей и органических растворителей. Буферы должны быть стерильны и свободны от посторонних частиц. Для очистки воды удобна патронная система фирмы Millipore (разд. 8.3). Органические растворители приемлемого качества продают фирмы Rathburn Chemicals, BDH, Burdick and Jackson, Fisons and Merck. По мере увеличения чувствительности анализа все большее значение приобретают пики примесей и дрейф базовой линии. При необходимости воду, используемую для приготовления буферов, можно дополнительно очистить, пропустив ее через колонку с грубой фракцией C_{18}-сорбента, например патроны Sep-Pak (фирма Waters). Органические растворители пропускают через слой активированного угля высшего качества, перегоняют на колонке Widmer или на установке с вращающейся мешалкой. Однако в руках новичка эта методика может скорее загрязнить, чем очистить растворители и обычно не является рентабельной с точки зрения цены и эффективности очистки. Ацетонитрил фирмы Rathburn (марка S), используемый в нашей лаборатории без очистки при градиентном разделении, вызывает дрейф базовой линии, составляющий 0,005—0,001 ед. опт. плотн.

Наличие загрязнений в реагентах и растворителях, используемых в анализе последовательности, является отдельным фактором, влияющим на чувствительность анализа. При необходимости реагент можно очистить, как описано в работе [8].

Качество уксусной кислоты и ацетата натрия не представляет проблемы, если используются продажные реактивы высшей степени чистоты. Растворители деаэрируют пропусканием через них сильного потока гелия в течение 2—3 мин, через водный буфер гелий барботируют в течение всего времени работы насосов, подающих растворы на колонку. Другие методы деаэрирования в нашей лаборатории дают менее надежные результаты, хотя любые методы, рекомендованные фирмами — производителями обору-

дования, при тщательном повседневном приготовлении буферов дают воспроизодимые результаты. Мы готовим исходный 1 М буфер, стерилизуем его фильтрованием. Буферы для хроматографического элюирования готовят каждые два дня разбавлением исходного буфера. Невозможно предотвратить случайное попадание и рост микроорганизмов в ацетатных буферах. Для предотвращения роста бактерий и грибов буфер А содержит небольшое количество ацетонитрила (см. разделение на C_8-колонке в разд. 13.2.1.5).

13.2.1.3. Хроматографические колонки. Возможности разделения на колонках продолжают улучшаться благодаря более строгому контролю производственных процессов, а также внедрению более эффективных сорбентов с постоянно уменьшающимся размером частиц. Для анализа ФТГ-производных аминокислот в настоящее время используется три типа обращенных фаз — октильная, октадецильная, цианопропильная. Несколько фирм выпускают колонки с сорбентами, покрытыми указанными фазами и различающиеся типом и размером частиц (3—10 мкм). Эти носители имеют разную степень покрытия углеводородными цепями и дополнительной модификации (блокировки) остаточных силанольных групп. В последние годы мы испытали много колонок разных фирм и отметили значительное улучшение воспроизводимости разделения. Однако до сих пор наблюдается существенное различие в разделении некоторых пар ФТГ-производных аминокислот на колонках различных фирм, по описанию заполненных сорбентом одного типа. Во многих случаях можно почти полностью разделить стандартную смесь (за исключением какой-либо одной пары ФТГ-производных), состоящую из 18 компонентов. Иногда в случае ФТГ-Arg и ФТГ-His наблюдается значительный «хвост». Мы считаем, что единственным решением этой проблемы разделения является опробование разных колонок. По нашему мнению, по воспроизводимости разделения ФТГ-аминокислот и продолжительности жизни колонки наиболее подходящими являются колонки Zorbax C_8 (фирмы Dupont). При проведении на этих колонках ~2000 анализов воспроизводимость времени удерживания ФТГ-производных аминокислот ото дня ко дню составляет 0,01 мин. По нашему опыту, единственной колонкой другого типа, дающей удовлетворительные результаты при хроматографии основных ФТГ-производных аминокислот, является цианопропильная колонка фирмы IBM.

13.2.1.4. Приготовление стандартных растворов ФТГ-производных аминокислот. Сухие ФТГ-производные (фирмы Pierce) растворяют в ацетонитриле или в метаноле до концентрации ~7,5 нмоль/мкл, отбирают по две аликвоты, разбавляют для измерения поглощения при 269 нм. Зная коэффициенты молярного поглощения (табл. 13.1), можно определить точную концентрацию растворов и разбавить каждый раствор до концентрации 5 пмоль/мкл. ФТГ-Arg и ФТГ-His обрабатывают специально. Гидрохлориды этих соединений можно перевести в растворимые трифтороацетаты путем добавления 20%-ной ТФУ, раствор затем упаривают в потоке азота. Высушенные таким образом ФТГ-производные затем растворяют в ацетонитриле и разбавляют до нужной концентрации, как указано выше. Готовят смесь, содержащую равные количества каждого ФТГ-производного (при разделении на C_8-колонках добавляют также ФТГ-производное норлейцина), разбавляют раствор до получения нужной концентрации ФТГ-производных аминокислот в подходящем объеме (например, 50 пмоль в 10 мкл). Растворы индивидуальных производных хранят при —20 °C в течение нескольких месяцев, а в виде смесей — несколько недель при той же температуре. Приготовление стандартных растворов ФТГ-Ser и ФТГ-Thr — особый случай и обсуждается ниже.

13.2.1.5. Разделение ФТГ-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Большинство из многочисленных опубликованных методик

Таблица 13.1. Молекулярные массы и экстинкция ФТГ-производных аминокислот

ФТГ-производные	Молекулярная масса	ε_{269}
ФТГ-Ala	206	16 000
ФТГ-Asn	249	17 200
ФТГ-Asp	250	16 100
ФТГ-Arg·HCl	328	15 900
ФТГ-Glu	264	15 900
ФТГ-Gln	263	17 000
ФТГ-Gly	192	14 900
ФТГ-His·HCl	309	15 500
ФТГ-Ile	248	17 000
ФТГ-Leu	248	16 700
ФТГ-N-ε-ФТК-Lys	398	29 000
ФТГ-Met	266	17 100
ФТГ-Phe	282	15 500
ФТГ-Pro	232	14 300
ФТГ-КМ-Cys	297	16 600
ФТГ-Trp	321	19 700
ФТГ-Tyr	298	15 600
ФТГ-Val	234	16 500

для анализа ФТГ-производных имеет лишь незначительные преимущества по сравнению с первоначальным вариантом разделения, предложенным в 1977 г. [20], когда использовали сорбент с октадецильной фазой (C_{18}), ацетатные буферы и ацетонитрил. Единственное серьезное затруднение вызывала хроматография ФТГ-Arg и ФТГ-His, которые элюировались в виде гораздо более широких зон, чем ФТГ-производные других аминокислот. На колонках выпуска последних лет, заполненных сорбентом с меньшим размером частиц и имеющих большее число теоретических тарелок, можно добиться значительно большей эффективности разделения, но анализ ФТГ-Arg и ФТГ-His до сих пор представляет проблему при использовании колонок с фазой C_{18}. Острота этой проблемы зависит от содержания свободных силанольных (кислых) групп, остающихся после модификации носителей. Существенное улучшение результатов разделения можно получить при использовании колонок с фазами C_8 (Dupont) и CN (IBM). Колонки фирмы Dupont (Zorbax C_8) наиболее пригодны для разделения ФТГ аминокислот, возможно, из-за того, что сорбент имеет высокую степень модификации остаточных силанольных групп. В данной главе приведены различные методики, заимствованные из литературы и модифицированные в нашей лаборатории.

Разделение на колонках с фазой C_8.

Буферы. Исходный 1 М ацетат натрия доводят до pH 4,1 уксусной кислотой. Работают с двумя буферами *A* и *B*, которые отличаются содержанием ацетонитрила. Оба буфера (*A* и *B*) содержат 0,008—0,02 М ацетата; буфер *A* содержит 10% ацетонитрила, буфер *B* — 80%. Растворы деаэрируют гелием. Колонка термостатирована при 43 °С, скорость потока элюента 2 мл/мин.

Колонка. Zorbax C_8, 4,6×250 мм (Dupont). Между инжектором и колонкой присоединена спираль из трубки длиной не менее 600 мм, помещенная в термостат для предварительного обогрева буфера.

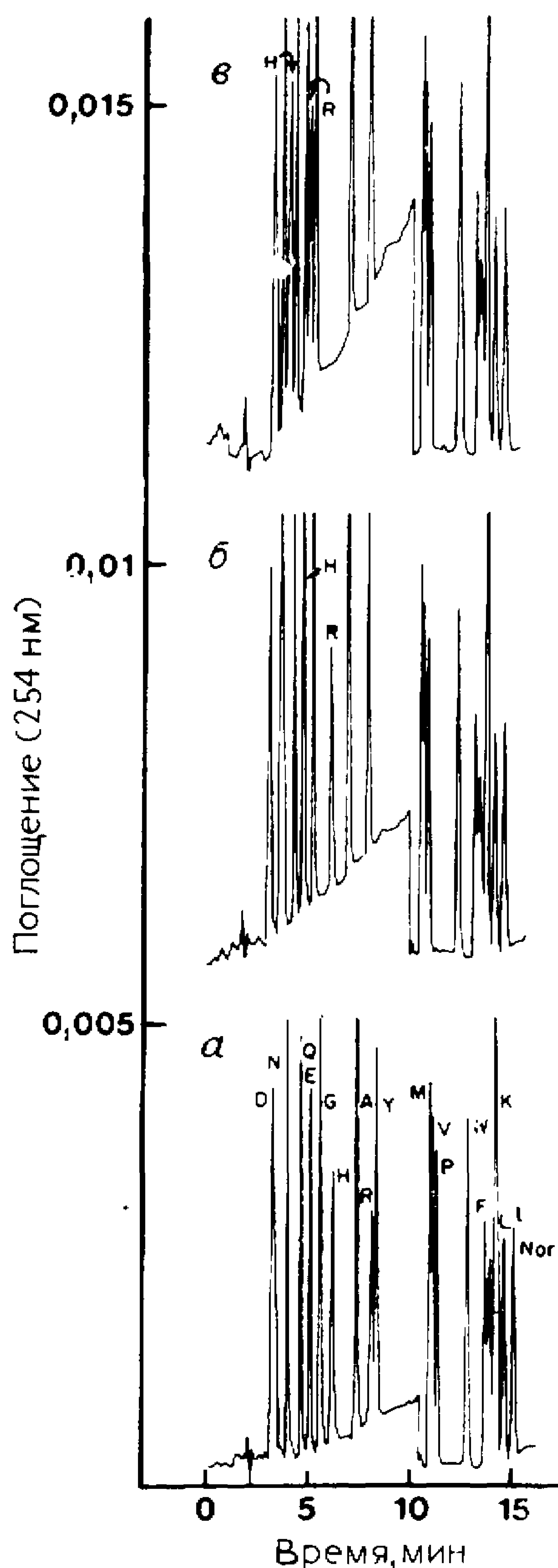


РИС. 13.1. ВЭЖХ ФТГ-производных аминокислот на колонке Zorbax C_8. Влияние концентрации соли в буфере на разделение производных Arg и His. Условия разделения приведены в разд. 13.2.1.5. Концентрация ацетата натрия (моль/л): *а* — 0,005, *б* — 0,01, *в* — 0,02. Обозначения аминокислот — в однобуквенном коде, Nor — ФТГ-производное норлейцина.

Условия анализа. Для оценки начальных условий разделения можно использовать линейный градиент буфера *B* от 20 до 40% в течение 8 мин. Результаты такого разделения показаны на рис. 13.1, *а*. Положения пиков ФТГ-Arg и ФТГ-His зависят от концентрации соли в буферах, и, как видно из рис. 13.1, *б* и *в*, при изменении концентрации соли пики этих веществ могут перемещаться относительно пиков ФТГ-производных других аминокислот. На разделение ФТГ-производных гидрофобных аминокислот влияет содержание буфера *B* в конце градиента. Проведя 2—3 анализа с различной конечной концентрацией этого буфера, можно оптимизировать разделение; изменение концентрации в 1% может оказаться решающим. Проведя оптимизацию хроматографических параметров, можно не менять условия разделения в течение нескольких недель. Точность анализа при этом зависит главным образом от воспроизводимости приготовления буферов. По мере старения колонки для сохранения прежнего положения пиков ФТГ-Arg и ФТГ-His на хроматограмме следует увеличивать концентрацию соли в буферах. Может потребоваться оптимизация условий элюирования этих двух соединений относительно ФТГ-производных других аминокислот и пиков побочных продуктов, образующихся в ходе реакций, протекающих в секвенаторе. На рис. 13.2 приведены кривые элюирования с C_8-колонки при определении ФТГ-производных аминокислот, полученных на газофазном секвенаторе.

Разделение на колонке с фазой C_{18}. Для анализа ФТГ-производных чаще всего используют колонки с фазой C_{18}, производимые фирмами

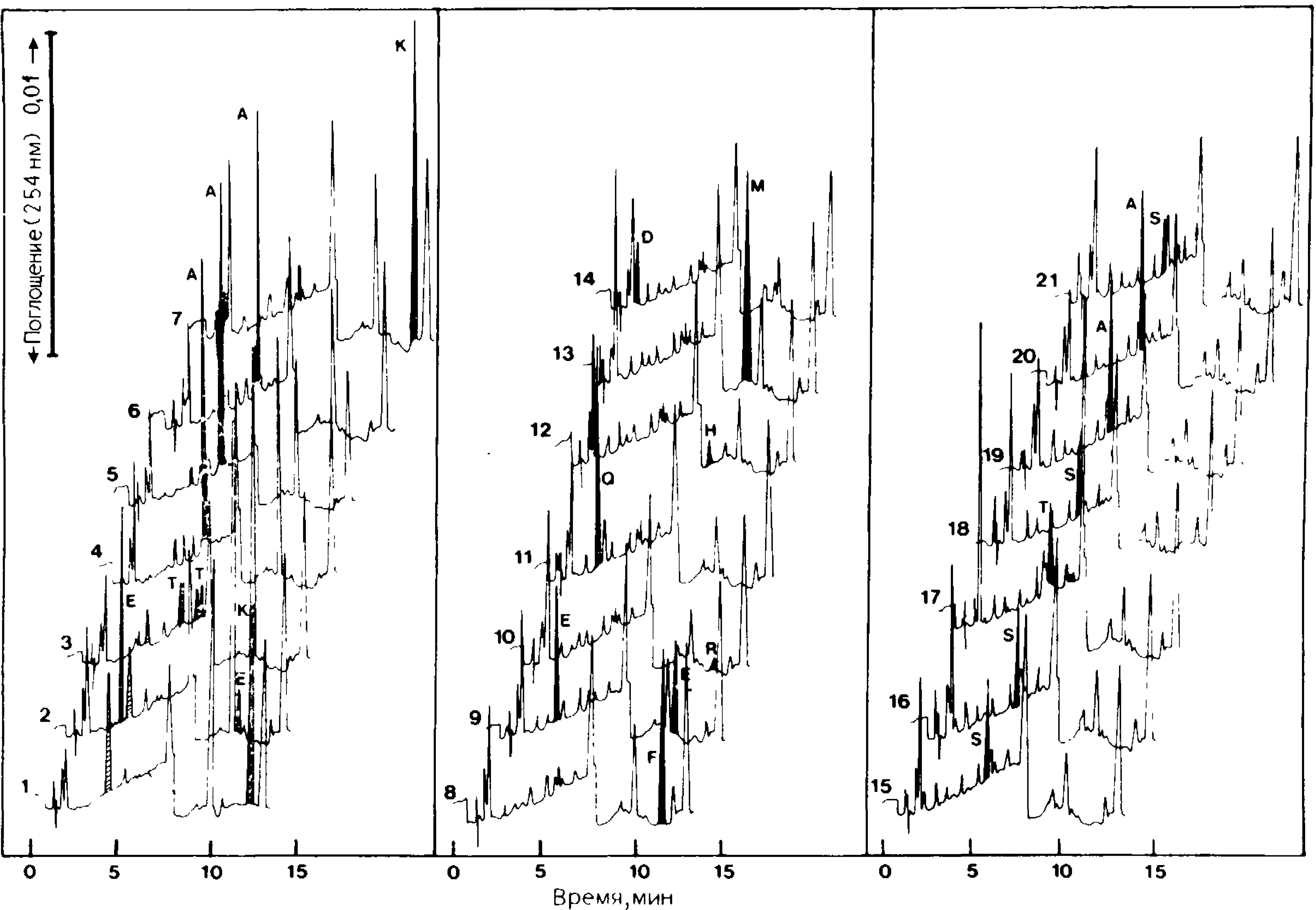


РИС. 13.2. ВЭЖХ продуктов 21 цикла анализа по Эдману рибонуклеазы (ГФ-секвенатор). Условия хроматографии приведены в разд. 13.2.1.5 (0,0025 М ацетат натрия). Обозначения пиков примесей указаны в подписи к рис. 13.3.

Dupon (Zorbax ODS), Waters (C_{18} μBondapak), Altex (Ultraspere ODS). Подробное описание методик для этих колонок можно получить от фирм-производителей и найти в журналах Analytical Biochemistry, Journal of Chromatography. Поскольку параметры колонок, производимых разными фирмами, сильно отличаются друг от друга, то это привело к появлению огромного числа публикаций, описывающих бесчисленное множество вариантов условий разделения. В последнее время значительно усовершенствованы как условия синтеза носителей, так и способы упаковки колонок, что позволяет надеяться на увеличение межлабораторной воспроизводимости результатов. Методология, описанная в работе [20], до сих пор лежит в основе серийного анализа. Хорошие результаты получают при использовании натрийацетатных буферов (pH 4,0—4,5) с концентрацией 0,001—0,04 моль/л, ацетонитрила или метанола в качестве органических модификаторов, а также градиента концентраций органического растворителя от 20 до 40% при температуре 40—45 °С. При этом остается проблема «хвостов» пиков ФТГ-Arg и ФТГ-His. При скоростях потока элюента до 2,5 мл/мин можно провести анализ менее чем за 20 мин. Ацетонитрил предпочтительнее метанола или этанола из-за более низкого уровня фона и меньшей вязкости при высоких концентрациях растворителя в буфере. Изменением концентрации соли в буфере можно повлиять на хроматографическое поведение ФТГ-Arg и ФТГ-His и на их положение относительно других ФТГ-производных аминокислот.

На разделение ФТГ-производных влияют температура, скорость потока элюента, концентрация органического растворителя, форма градиента. При оптимизации условий разделения на новой колонке полезно провести анализ при четырех разных температурах (например, при 25, 35, 45 и 55 °С), для оптимизации анализа производных гидрофобных аминокислот изменить конечную концентрацию ацетонитрила, скорость изменения градиента. Важное значение имеет предварительный подогрев буфера, проводимый в соединительной трубке, помещенной между инжектором и колонкой. При необходимости следует изучить влияние pH. В литературе описаны примеры использования колонок с фазой C_{18}, например:

1) колонка Zorbax ODS (Dupont); система ацетат натрия — ацетонитрил [5, 13, 20];

2) колонка μBondapak (Waters); ацетат натрия — метанол [19, 17];

3) колонка Ultrasphere ODS (Altex); ацетат натрия — ацетонитрил с добавкой ТГФ [16].

Разделение на колонках с CN-фазой.

Буферы. Исходный 1 М ацетат натрия доводят уксусной кислотой до pH 5.7. Буфер *A* — 0,015—0,04 М ацетат натрия, содержащий 15% буфера *B*, который в свою очередь состоит из метанола (50%) и ацетонитрила (50%). Буферы деаэрируют гелием, элюирование приводят при 32 °С со скоростью 1 мл/мин. Для оптимизации разделения состав буфера меняют, как указано далее.

Колонка. Цианопропильная (IBM), размером 4,6×250 мм. Опубликованы условия полного разделения смеси ФТГ-производных обычных аминокислот на колонках Zorbax CN (Dupont) [10] и CN (IBM) [8]. Главное преимущество цианопропильных колонок перед колонками с фазой C_{18} — лучшая форма пиков ФТГ-Arg и ФТГ-His, большее время жизни колонки (число вводов пробы), большая чувствительность (отношение высота пика : количество ФТГ). Мы испытывали с 1982 г. колонки C_8, C_{18} и цианопропильные и нашли, что в отношении формы пиков ФТГ-Arg и ФТГ-His колонки с фазами C_8 и цианопропил имеют преимущество перед C_{18}-колонками. По нашему опыту, срок службы C_8-колонок и цианопропил (число вводов пробы) сопоставим. У нас нет опыта работы с колонками Zorbax ODS, достаточного для заключения о сроках службы этих колонок.

Оптимизацию разделения на цианопропильных колонках проводят из-

менением концентрации соли; добиваются того, чтобы пики ФТГ-Arg и ФТГ-His оказались между пиками ФТГ-производных других аминокислот. Увеличение концентрации соли сокращает время элюирования этих соединений. Следует учитывать, что наличие побочных продуктов реакции Эдмана может диктовать свои условия выбора положения пиков ФТГ-Arg и ФТГ-His. По мере старения колонки для поддержания постоянства времени элюирования производных основных аминокислот необходимо увеличивать концентрацию соли. Для оптимизации разделения ФТГ-производных Tyr, Val, Pro, Met следует менять соотношение ацетонитрила и метанола в буфере *B*. Увеличение концентрации метанола улучшит разделение производных Pro и Met, а снижение улучшит разделение ФТГ-Tyr и ФТГ-Val. Для оптимизации разделения производных Asn, Ser, Thr, Gln, Gly следует изменить начальную концентрацию буфера *B* и крутизну градиента буфера *B*. При наличии программирующего устройства можно поддерживать многоступенчатые градиенты, подобные описанным в работе [8], и благодаря этому добиться оптимального разделения. При воспроизведении этих градиентов следует учитывать различие в объемах смесителей разных систем.

Разделение ФТГ-производных аминокислот на фенилалкильных колонках. Описано эффективное, но длительное разделение на колонках μBondapak (фирма Waters) [6].

13.2.1.6. Анализ ФТГ-производных аминокислот в продуктах отщепления по Эдману. При анализе более чем 1 нмоль исходного пептида идентификация ФТГ-производных обычных аминокислот, полученных в ходе ручного или автоматического определения последовательности по Эдману, является однозначной. При работе с количествами >1 нмоль образца примеси, вносимые из секвенаторных реактивов, обычно не влияют на ВЭЖХ.

ФТГ-Arg и ФТГ-His. Для превращения анилинотиазолинонов в ФТГ-производные аминокислот лучше использовать не HCl, а ТФУ. Может потребоваться очистка ТФУ (обработка хромовой кислотой, перегонка над дитиотреитом для получения чистой ТФУ, свободной от пероксидов) [8]. Конверсию проводят с 20%-ной ТФУ при 55 °C в течение 20 мин. Затем кислоту удаляют в токе азота, образец растворяют в ацетонитриле. При этом ФТГ-Arg и ФТГ-His анализируются в форме трифтороацетатов, а не гидрохлоридов. Эта методика требует приготовления стандартов в виде трифтороацетатов (разд. 13.2.1.4). Время выхода с колонки указанных ФТГ-производных оптимизируют, меняя концентрацию соли в буфере.

ФТГ-Asp и ФТГ-Glu. Эти ФТГ-производные характеризуются небольшими временами удерживания, и при количественном анализе встречаются затруднения либо из-за образования множественных пиков, либо вследствие выходов этих производных из колонки совместно с дитиотреитом, добавляемым в секвенаторные реагенты и растворители в качестве антиоксиданта. В случае ГФ-анализа показано, что это несущественно при использовании колонки с фазой C_8 (рис. 13.2). Для увеличения времени удерживания ФТГ-производных кислых аминокислот их можно этерифицировать [8].

Методика. Готовят 1 М раствор ацетилхлорида в тщательно охлажденном метаноле (см. разд. 8.17.1.1). К пробе добавляют 50 мкл полученного раствора, выдерживают реакционную массу в течение 20 мин. Реагент удаляют испарением в потоке азота, образец растворяют в ацетонитриле. Положение пиков метиловых эфиров производных Asp и Glu показано на рис. 13.3. При анализе ФТГ-производных в виде метиловых эфиров повышается точность количественного анализа из-за того, что эти сложные эфиры элюируются в области низкого уровня фона примесей, появляющихся в реакции Эдмана. Если необходимо получить иное положение пиков искомых ФТГ относительно пиков примесей, то можно синтезировать этиловые эфиры тех же ФТГ.

ФТГ-Ser и *ФТГ-Thr.* Анализ этих ФТГ-производных лучше всего проводить, предприняв некоторые меры предосторожности (добавление антиокси-

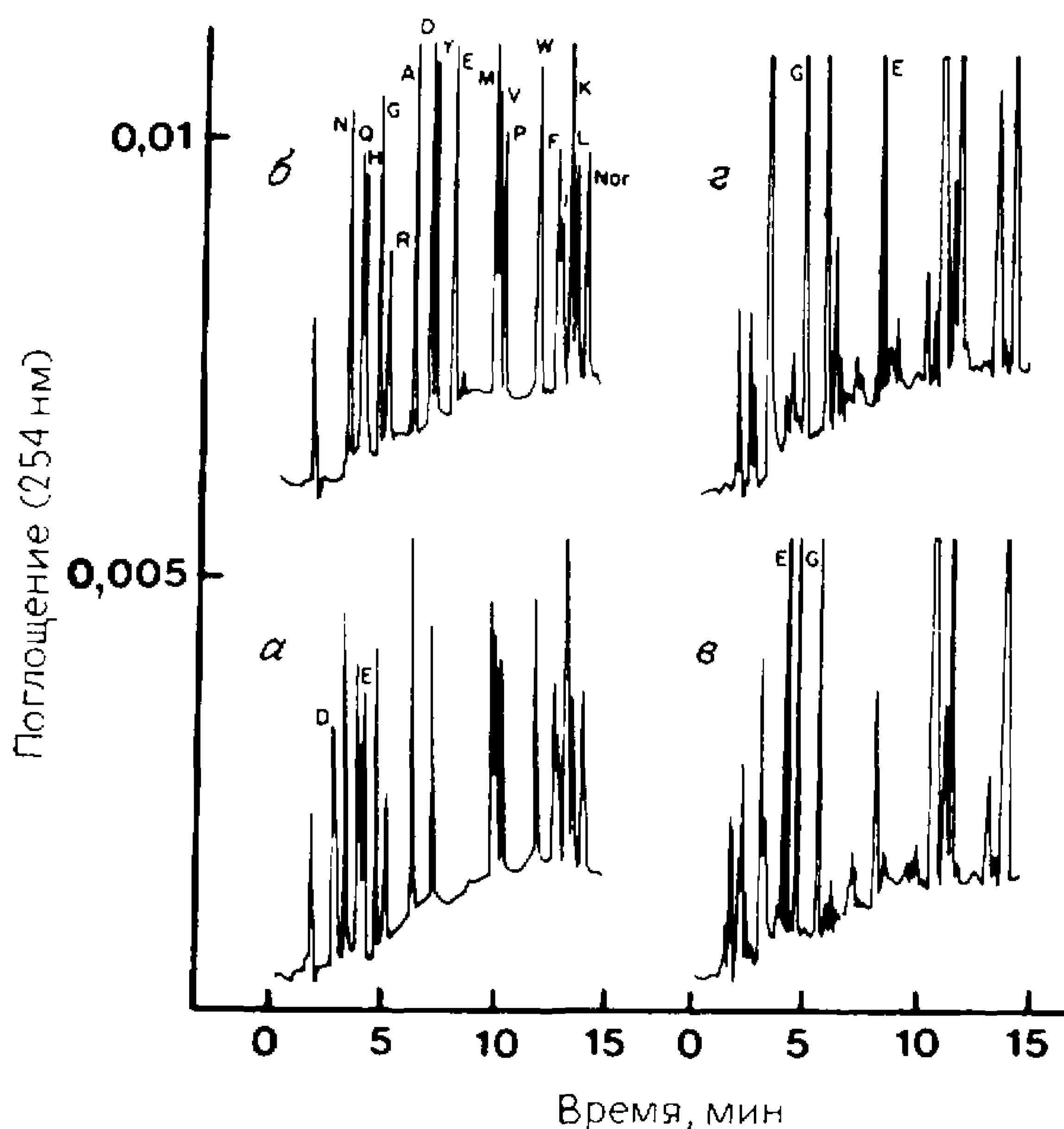


РИС. 13.3. ВЭЖХ метиловых эфиров ФТГ-Asp и ФТГ-Glu. Условия ВЭЖХ указаны в разд. 13.2.1.5; условия этерификации — в разд. 13.2.1.6. *а* — разделение стандартной смеси ФТГ-производных аминокислот (40 пмоль, шкала — 0,005 е. о. п.); *б* — та же смесь, содержащая метиловые эфиры; *в* и *г* — разделение продуктов 2-го цикла отщепления по Эдману (рибонуклеаза, ГФ-секвенатор, 0,005 е. о. п.); *в* — прямое определение ФТГ-Glu; *г* — анализ метилового эфира ФТГ-Glu. Перед началом анализа к каждому образцу добавлено ФТГ-производное норлейцина (ФТГ-Nor). Указаны пики типичных примесей (дитиотреит) и побочных продуктов взаимодействия ФИТЦ с диметиламином, а также продукты разложения ФИТЦ. Для удаления примесей, реагирующих с аминогруппами, добавлен Gly-Gly, дающий ФТГ-Gly.

дантов, например дитиотреита, во все растворители, перегонка ТФУ или гептафтормасляной кислоты над дитиотреитом). Важно проводить конверсию водной кислотой немедленно после сбора отщепленных АТЗ в коллекторе фракций. Можно добавлять раствор АТЗ в хлорбутане к раствору ТФУ в конверторе с последующим быстрым высушиванием, что помогает увеличить выход ФТГ-производных этих аминокислот. Для быстрого проведения этого процесса лучше всего использовать автоматический конвертор.

Коммерческие препараты ФТГ-Ser и ФТГ-Thr могут быть не идентичны тем же производным, отщепленным на секвенаторе. Лучше всего определять время выхода и проводить количественный анализ производных Ser и Thr, анализируя белок известной структуры, содержащий Ser и Thr (например, Ser-3 в миоглобине кашалота, Thr-3 в рибонуклеазе быка; см. рис. 13.2). Учитывая выход аминокислот, стоящих в последовательности до и после остатков Ser и Thr, можно определить поправку на разрушение ФТГ-производных этих аминокислот. Эти же белки можно использовать для оптимизации условий работы секвенатора и увеличения выхода ФТГ-производных аминокислот (рис. 13.2).

Надежность обнаружения ФТГ-Ser и ФТГ-Thr можно повысить, детектируя их дегидропроизводные на длине волны 314 нм. Для продуктов отщепления на секвенаторе величина поглощения при 314 нм сильно меняется, так как могут образовываться не только дегидропроизводные, но и продукты присоединения к ним дитиотреита. По нашим данным, ФТГ-Thr, полученный на газофазном секвенаторе, дает два или четыре пика, два из которых элюируются до и после ФТГ-Tyr на колонке C_8 (рис. 13.2). Полученный в тех же условиях ФТГ-Ser выходит с колонки непосредственно перед производным Ala (рис. 13.2). Вещества, элюируемые в этих положениях, не поглощают при 314 нм. При работе на ЖФ-, ТФ-, ГФ-секвенаторах получаются разные результаты. Лучшим решением вопроса в этих случаях является, как указано ранее, анализ стандартного белка.

ФТГ-Cys. Методика идентификации остатков Cys зависит от природы химической модификации сульфгидрильной группы остатка цистеина до анализа на секвенаторе. Для количественной оценки содержания цистеина наиболее удобно использовать меченое [C^{14}]-карбоксиметильное производное, полученное восстановлением и последующим алкилированием образца [C^{14}]-иодоацетамидом. Все отщепленные остатки проверяют на наличие радиоактивности. Кроме того, можно определить время элюирования соответствующего производного цистеина, оценить количественно его содержание и использовать эти данные для хроматографической оценки содержания Cys. Можно анализировать и ФТГ-производное цистеиновой кислоты, однако оно элюируется с колонки очень быстро, и при наличии многих соединений, также выходящих с колонки, содержание ФТГ-производного цистеиновой кислоты трудно оценить (тем более количественно).

13.2.1.7. Высокочувствительный анализ. При анализе образцов, содержащих <1 нмоль полипептида, наличие посторонних соединений, появляющихся из реактивов, растворителей и даже из пробы образца, может вызвать большие затруднения при идентификации. Реактивы собственной очистки следует дочищать, покупные — проверять на чистоту. Методики очистки приводятся в работах [7, 8].

Моно- и дифенилтиомочевина — обычные примеси, образующиеся в ходе реакции Эдмана в ГФ-секвенаторе при взаимодействии ФИТЦ с диметиламином. Кроме того, дополнительные пики на хроматограммах дают полибрен и примеси, присутствующие в органических растворителях и буфере, используемом на стадии карбамоилирования.

13.2.2. Газожидкостная хроматография

В нескольких работах излагаются условия ГЖХ ФТГ-производных аминокислот. Особый интерес представляют два практических обзора [1, 15]. В руководствах фирмы Bekman Instruments дано детальное описание условий ГЖХ-анализа.

13.2.3. Тонкослойная хроматография

Существует практическое руководство по одномерному анализу ФТГ-производных аминокислот методом ТСХ [3]. Большое достоинство метода заключается в возможности одновременного анализа сразу нескольких остатков, отщепленных на секвенаторе. Следует анализировать ≥ 1 нмоль образца; предпочтительнее иметь дело с 50—70 нмоль. Наличие остаточных аминокислот сильно затрудняет интерпретацию результатов, поэтому для их подтверждения рекомендуется использовать второй метод. Для определения ФТГ-Arg и ФТГ-His следует проводить ВЭЖХ или ставить обратный гидролиз с последующим аминокислотным анализом продуктов гидролиза.

Двумерное разделение чрезвычайно удобно для идентификации, так как на одну сторону пластинки можно нанести смесь стандартов, а на другую — образец. Чувствительность определения повышается при добавлении к хроматографическому растворителю флуоресцирующего индикатора. Анализ можно проводить на листах полиамида (50×50 мм), а хроматографию — в небольших закрытых сосудах. Эта методика не позволяет обнаруживать ФТГ-Arg и ФТГ-His, но она используется в некоторых лабораториях как ценное дополнение к другим методам.

13.2.4. Обратный гидролиз ФТГ-производных аминокислот

Описано несколько реагентов для обратного гидролиза (щелочи, иодоводородная кислота, метансульфоновая кислота, соляная кислота). Лучше всего работает методика, по которой образец гидролизуют 6 М соляной кислотой, содержащей 0,1% хлорида олова(II) [14]. Образцы высушивают в стеклянных ампулах для гидролиза, добавляют реагенты, продувают азотом для удаления кислорода, запаивают под вакуумом. Гидролизуют при 150 °С в течение 4 ч. Затем образцы сушат и анализируют аминокислотный состав. При этом из большинства тиазолинонов можно получить с хорошим выходом соответствующие аминокислоты. Thr превращается в α-аминомасляную кислоту, Ser — в Ala, а Trp — в Gly. Поэтому для идентификации Ser и Trp необходим второй метод определения (ТСХ, ГЖХ или ВЭЖХ).

Литература

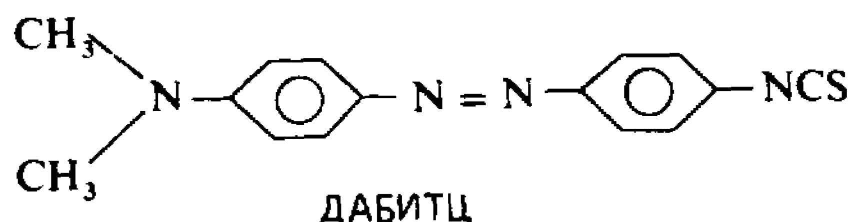
1. *Bridgen J., Graffeo A. P., Karger B. L., Waterfield M. D.*, In: Instrumentation in Protein Sequence Analysis, Perham R. N. (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco, pp. 111—145, 1975.
2. *Edman P., Begg G.*, Europ. J. Biochem., **1**, 80—91 (1967).
3. *Edman P., Henschen A.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), 2nd edn., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 232—279 (1975).
4. *Harris J. U., Robinson D., Johnson A. J.*, Anal. Biochem., **105**, 239—245 (1980).
5. *Hawke D., Pau-Miau Y., Shively J. E.*, Anal. Biochem., **120**, 302—311 (1982).
6. *Henderson L. E., Copeland T. D., Oroszlan S.*, Anal. Biochem., **102**, 1—7 (1980).
7. *Hewick R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W. J.*, J. Biol. Chem., **256**, 7990—7997 (1981).
8. *Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Methods Enzymol., **91**, 486—493 (1983).
9. *Hunkapiller M. W., Hewick R. M., Dreyer W. J., Hood L. E.*, Methods Enzymol., **91**, 399—413 (1983).
10. *Johnson N. D., Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Anal. Biochem., **100**, 335—338 (1979).
11. *Kulbe K. D.*, Anal. Biochem., **44**, 548—558 (1971).
12. *Kulbe K. D.*, Anal. Biochem., **59**, 564—573 (1974).
13. *Margolies M. N., Brauer A.*, J. Chromatorg., **148**, 429—439 (1978).
14. *Mendez E., Lai C. Y.*, Anal. Biochem., **68**, 47—53 (1975).
15. *Niall H. D.*, Methods Enzymol., **27**, 942—1010 (1973).
16. *Somack R.*, Anal. Biochem., **104**, 464—468 (1980).
17. *Sottrup-Jensen L., Petersen T. E., Magnusson S.*, Anal. Biochem., **107**, 456—460 (1980).
18. *Summers M. R., Smythers G. W., Oroszlan S.*, Anal. Biochem., **53**, 624—628 (1973).
19. *Zeeuws R., Strosberg A. D.*, FEBS Lett., **85**, 68—72 (1978).
20. *Zimmerman C. L., Apella E., Pisano J. J.*, Anal. Biochem., **77**, 569—573 (1977)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 4-ДИМЕТИЛАМИНОАЗОБЕНЗОЛ-4′-ИЗОТИОЦИАНАТА (В РУЧНОМ ВАРИАНТЕ)

Дж.-Ю. ЧАНГ (J.-Y. CHANG, *Pharmaceuticals Research Laboratories, CIBA-GEIGY Limited, 4002 Basle, Switzerland*)

14.1. Введение

Определение аминокислотной последовательности пептидов деградацией по методу Эдмана основано на идентификации отщепленных фенилтиогидантоинов (ФТГ) аминокислот [11] по поглощению в УФ-свете (λ_{max}=269 нм, ε=16 000). В модифи-



ДАБИТЦ

кации метода с использованием вместо фенилизотиоцианата (ФИТЦ) 4-диметиламиноазобензол-4′-изотиоцианата (ДАБИТЦ) образующиеся аминокислотные производные 4-диметиламиноазобензол-4′-тиогидантоины (ДАБТГ) — окрашенные соединения с λ_{max}=520 нм (в кислой среде) и ε=47 000. Идентификация ДАБТГ-производных аминокислот в видимой области удобна и возможна на более высоком уровне чувствительности, чем для ФТГ-производных. ДАБТГ-производные нашли применение как для N-концевого анализа пептидов [6], так и для определения аминокислотной последовательности.

Разработана методика, комбинирующая два типа конденсации ДАБИТЦ—ФИТЦ для жидкофазного [5, 7, 10] и твердофазного [4, 7] методов анализа.

14.2. Реагенты и растворители

ДАБИТЦ синтезируют, как описано в работах [8, 9], или используют коммерческий препарат (фирмы Fluka и Pierce). ФИТЦ (фирма Merck) перегоняют под азотом при пониженном давлении ($t_{кип}$≈92 °C/12 мм рт. ст.). Пиридин (фирма Merck) трижды перегоняют: 1) над KOH (10 г/л), 2) нингидрином (1 г/л) и 3) KOH (10 г/л). Трифторуксусную кислоту (фирма Fluka) перегоняют над $CaSO_4 \cdot 0,5H_2O$ (10 г/л). Можно использовать пиридин («для секвенирования») и ТФУ фирмы Pierce.

Полипептид 1—10 нмоль. Добавляют 80 мкл 50%-ного водного пиридина и 40 мкл ДАБИТЦ в пиридине (10 нмоль/мкл). Инкубируют под азотом при 52 °C 50 мин. Добавляют 10 мкл ФИТЦ и инкубируют еще 30 мин.

Экстрагируют смесью гептан — этилацетат (2 : 1) по 500 мкл 4 раза. Высушивают досуха в вакууме или в потоке азота.

Добавляют 50 мкл безводной ТФУ. Инкубируют (под азотом) 15 мин при 52 °C. Удаляют растворитель высушиванием в вакууме или в потоке азота.

Добавляют 50 мкл воды. Экстрагируют тиазолиноны 200 мкл бутилацетата и высушивают экстракт в вакууме для превращения в ДАБТГ-производные аминокислот.

Остаток подвергают следующему циклу деградации.

РИС. 14.1. Схема 1. Последовательность стадий в одном цикле жидкофазной деградации с использованием ДАБИТЦ — ФИТЦ-реагента.

Остальные растворители квалификации «для анализа» применяют без очистки.

Для идентификации используют полиамидные пластинки фирм Schleicher and Schüll или Cheng-Chin Co. Аминирование стеклянных шариков (CPG-75, фирма Serva) и их активацию *п*-фенилендиизотиоцианатом (ДИТЦ) проводят, как описано в гл. 12 [1].

14.3. ДАБИТЦ — ФИТЦ-методика в жидкофазном варианте [5, 10]

Цикл деградации по ДАБИТЦ—ФИТЦ-методике схематически представлен на рис. 14.1. Следует обратить внимание на то, что

1) ДАБИТЦ не очень стабилен в пиридине, и его раствор лучше готовить ежедневно или перед каждым циклом деградации;

2) некоторые гидрофобные пептиды имеют тенденцию к осаждению в виде мелких частичек или тонкой пленки во время экстракции. Осадок концентрируется обычно на поверхности раздела водной и органической фаз после центрифугирования и может быть по невнимательности удален пипеткой.

14.4. ДАБИТЦ — ФИТЦ-методика в твердофазном варианте [4]

Присоединение пептида или белка к активированному с помощью ДИТЦ аминостеклу и цикл твердофазной деградации по ДАБИТЦ—ФИТЦ-методике проводят, как изображено схематически на рис. 14.2. Конденсация пептида с твердым носителем и последующий анализ последовательности осуществляют в пробирках со стеклянными пробками, на дне которых находится «магнит» (2×6 мм). Помещают пробирку в нагревательный блок (52 °C) над магнитной мешалкой. На каждой стадии сушки используют стеклянную пробку (С-10) с пори-

а

Полипептид 1—10 нмоль
↓ +0,8 мл 0,2 *М* $NaHCO_3$ — NaOH, pH 8,9
↓ +20—25 мг ДИТЦ-стекла
↓ N_2, 52 °С, 1 ч
↓ +20 мкл этаноламина
↓ N_2, 52 °С, 15 мин
↓ Промывка H_2O и CH_3OH
↓ Сушка в вакууме
↓ +600 мкл 67%-ного водного пиридина
↓ +50 мкл ФИТЦ
↓ N_2, 52 °С, 30 мин
↓ Промывка CH_3OH
↓ Сушка в вакууме
↓ +200 мкл ТФУ
↓ N_2, 52 °С, 15 мин
↓ Промывка CH_3OH
↓ Сушка в вакууме
↓ ДАБИТЦ — ФИТЦ-деградация

б

↓ +400 мкл 50%-ного водного пиридина
↓ +200 мкл ДАБИТЦ (15 нмоль/мкл пиридина)
↓ N_2, 52 °С, 45 мин
↓ +20 мкл ФИТЦ
↓ N_2, 52 °С, 30 мин
↓ Удаление супернатанта после легкого центрифугирования
↓ Промывка 2 мл пиридина и 2 раза по 2 мл CH_3OH
↓ Сушка в вакууме
↓ +200 мкл ТФУ
↓ N_2, 52 °С, 15 мин
↓ Удаление ТФУ в вакууме
↓ Экстракция* тиазолинона 300 мкл CH_3OH
↓ Промывка CH_3OH
↓ Сушка в вакууме
↓ Следующий цикл деградации

* Идентификация ДАБТГ-аминокислот описана в тексте.

РИС. 14.2. Схема 2. Последовательность операций в иммобилизации пептида на твердом носителе (*а*) и цикле твердофазной деградации с использованием ДАБИТЦ — ФИТЦ-реагента (*б*).

стым фильтром (D2), чтобы предотвратить потери стеклянных шариков. Стеклянная матрица не должна подвергаться сильному перемешиванию во избежание растирания в порошок.

14.5. Превращение тиазолинонов аминокислот в тиогидантоины

Экстракт, содержащий тиазолинон аминокислоты, полученный при жидкофазной или твердофазной деградации, упаривают и остаток обрабатывают смесью 5 *М* HCl—CH_3COOH (1 : 2) при 52 °С, 50 мин. Образец высушивают и перерастворяют в подходящем объеме этанола для последующей идентификации.

14.6. Идентификация ДАБТГ-аминокислот

14.6.1. Тонкослойная хроматография

Все ДАБТГ-аминокислоты, кроме Ile и Leu, идентифицируют тонкослойной хроматографией на полиамидных пластинках (25×25 мм). Образцы наносят в угол пластинки на расстоя-

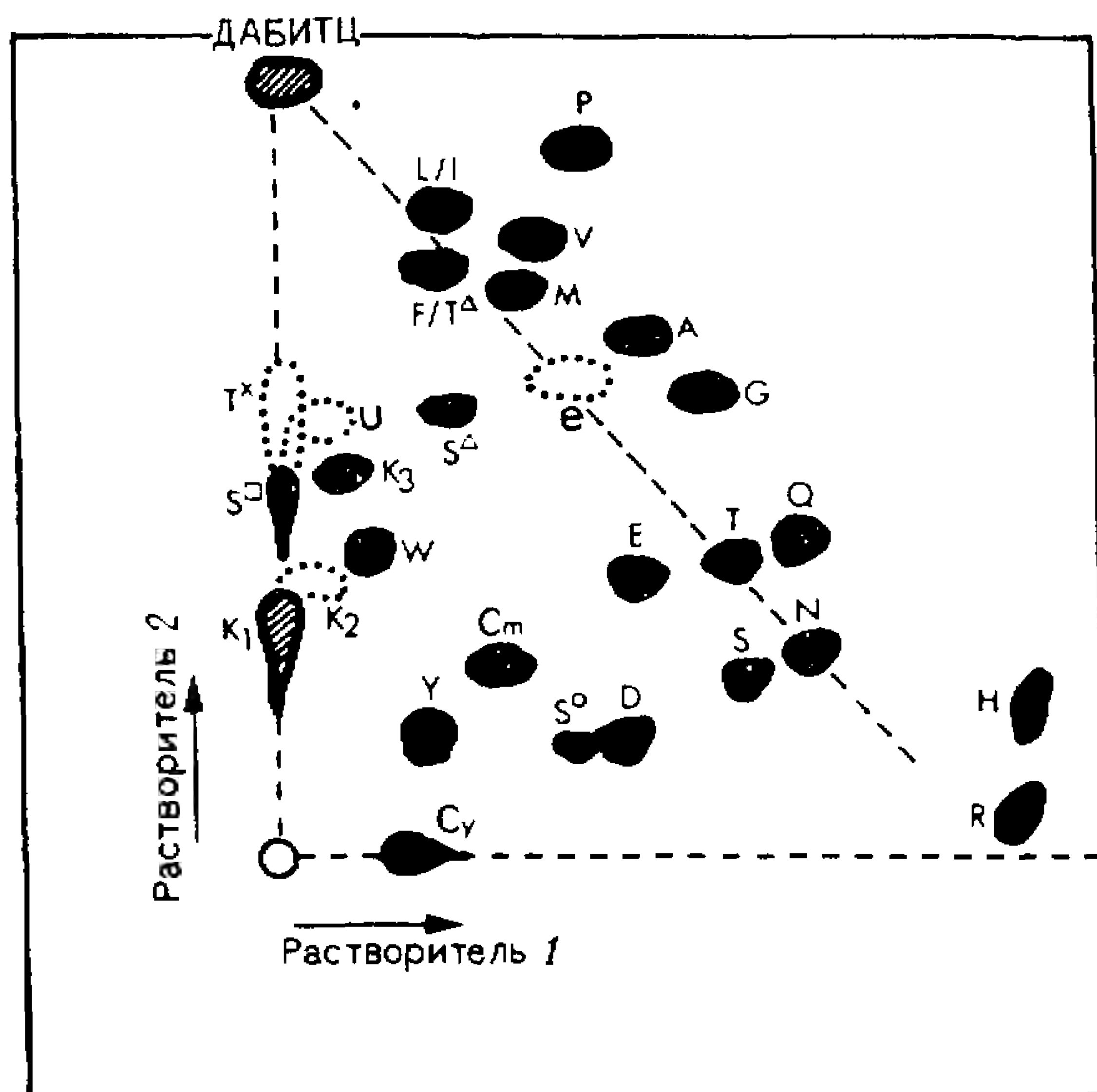


РИС. 14.3. Разделение на полиамиде ДАБТГ-производных аминокислот и побочных продуктов реакции.

Растворитель *1*: вода — уксусная кислота (2 : 1); растворитель *2*: толуол — *н*-гексан — уксусная кислота (2 : 1 : 1). ДАБТГ-производные обозначения однобуквенным кодом для соответствующих аминокислот. Темные пятна — пятна производных, окрашенные в красный цвет; обведенные точками пятна — в голубой, заштрихованные — в оранжевый. е — ДАБТК-производное диэтиламина; U — побочные продукты разложения избытка реагента. Подробно о ДАБТГ-производных серина, треонина, лизина см. работу [3].

нии 6 мм от прилегающих сторон с помощью микропипетки на 1 мкл (*H. E. Pederson*) с тонким, тщательно отшлифованным сферическим кончиком. Диаметр пятна не должен превышать 1 мм, при нанесении пользуются феном с холодным воздухом. Двумерную хроматографию проводят в закрытых камерах (30×80×80 мм) в восходящем потоке растворителя. Насыщение фазами необязательно. Растворитель *1* (в первом направлении): вода — уксусная кислота (2 : 1), растворитель *2* (во втором направлении): толуол — *н*-гексан — уксусная кислота (2 : 1 : 1).

Разделение производных Ile и Leu достигается одномерной хроматографией на пластинках с силикагелем в системе хлороформ — этанол (100 : 3) [9]. После высушивания пластинку помещают в пары HCl, при этом желтые пятна превращаются в красные или голубые (рис. 14.3). Успешная идентификация ДАБТГ-производных аминокислот в значительной степени за-

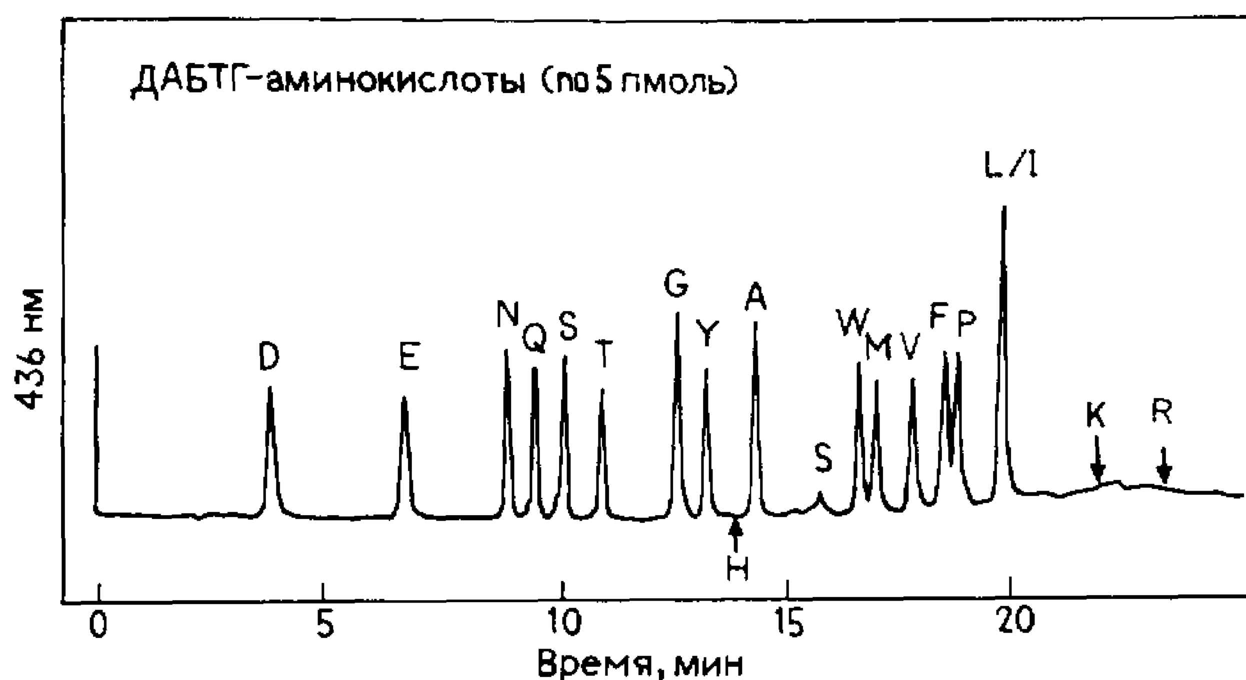


РИС. 14.4. Разделение смеси ДАБТГ-производных аминокислот (5 пмоль каждого) методом ВЭЖХ на колонке Zorbax ODC. Условия хроматографии: растворитель *А* — 35 мМ ацетатный буфер (pH 5,0), растворитель *Б* — ацетонитрил. Градиент от 45 до 70% буфера *Б* в течение временного интервала 0—10 мин; 70% *Б* 10—12 мин; 70—80% *Б* 12—14 мин; 80% *Б* 14—22 мин; 80—45% *Б* 22—25 мин. Температура колонки 22 °С. Скорость ленты самописца 40 см/ч. Детекция при 436 нм, шкала — 0,005 опт. ед.

висит от искусства экспериментатора в проведении хроматографии и интерпретации полученных результатов [2, 10].

Необходима большая практика для того, чтобы корректно идентифицировать производные таких аминокислот, как серин, треонин и лизин, каждое из которых дает на хроматограмме несколько пятен [3, 10].

14.6.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

ДАБТГ-производные аминокислот могут быть проанализированы с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе (рис. 14.4; условия указаны в подписи). Метод делает возможным количественную оценку результатов и особенно удобен в сочетании с твердофазной деградацией. Однако при анализе не проявляются различия в окраске между тиокарбамильными производными (голубые) и тиогидантоинами (красные), которые отчетливо видны на тонкослойной хроматограмме.

14.7. Заключение

Ниже перечислены основные преимущества ДАБИТЦ—ФИТЦ-методики по сравнению со стандартными методиками ручного определения аминокислотной последовательности.

1. Чувствительность: 1—10 нмоль пептида или белка достаточно для определения последовательности в 20—30 остатков, что в 10—20 раз превышает возможности других методов.

2. Эффективность: последовательность в 20—30 аминокислот может быть установлена без особых затруднений как в жидкофазном, так и в твердофазном вариантах деградации. Таким образом, этот метод существенно не уступает автоматическим методам секвенирования.

3. Простота: для реализации методики необходимо простое оборудование. Использование ТСХ, хотя и не обеспечивает количественной оценки, однако позволяет с достаточной степенью надежности идентифицировать все ДАБТГ-производные аминокислот.

Литература

1. *Bridgen J.*, Biochemistry, **15**, 3600—3604 (1976).
2. *Chang J.-Y.*, Biochem. J., **163**, 517—520 (1977).
3. *Chang J.-Y.*, Biochem. Biophys. Acta, **578**, 175—187 (1979).
4. *Chang J.-Y.*, Biochem. Biophys. Acta, **578**, 188—195 (1979).
5. *Chang J.-Y.*, Biochem. J., **199**, 557—564 (1981).
6. *Chang J.-Y.*, Methods Enzymol., **91**, 79—84 (1983).
7. *Chang J.-Y.*, Methods Enzymol., **91**, 455—466 (1983).
8. *Chang J.-Y., Creaser E. H., Beatley K. W.*, Biochem. J., **153**, 607—611 (1976).
9. *Chang J.-Y., Creaser E. H., Hughes G. J.*, J. Chromatogr., **140**, 125—128 (1977).
10. *Chang J.-Y., Brauer D., Wittmann-Liebold B.*, FEBS Lett., **93**, 205—214 (1978).
11. *Edman P., Henschen A.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), 2nd ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 232—279 (1975).

Глава 15

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОГО ЖИДКОФАЗНОГО АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

М. ЗИГЕЛЬМАН, Дж. Д. КАПРА (M. SIEGELMAN, J. D. CAPRA, *Department of Microbiology, The University of Texas Health Science Centre at Dallas, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, Texas 75235, U.S.A.*)

15.1. Введение

Создание автоматического пептидно-белкового секвенатора [1], его последующие усовершенствования и использование оказали большое влияние на методологию определения структуры белков. Вклад автоматических методов в изучение структуры белков можно оценить по быстрому росту накопленных данных о структурах [4—8]. Назрела необходимость создания компьютерных систем хранения и выдачи данных для того, чтобы можно было полнее использовать опубликованные последовательности аминокислот (прим. ред. в конце главы).

Определение структуры белков сегодня оказывает гораздо большее влияние на решение биологических проблем, чем 15—20 лет назад. Это обстоятельство объясняется необычайной эффективностью современных приборов и чувствительностью систем детекции, позволяющих исследователю определять полную структуру белка, располагая <100 нмоль материала.

В этой главе рассматриваются некоторые методики, используемые в настоящее время в автоматическом ЖФ-анализе аминокислотной последовательности пептидов и белков. Рассматриваются правила эксплуатации прибора, методы подготовки образца и способы контроля состояния прибора. Помимо этого, обсуждаются вопросы использования носителей и основные проблемы автоматического определения последовательности. Опубликованы обширные обзоры по каждому из упомянутых вопросов [10, 14, 16].

15.2. Подготовка образца

Невозможно обсуждать размер навески и степень пригодности образца для проведения анализа, не упоминая об особенностях и возможностях самого прибора, выбранной программы анализа, вспомогательного оборудования, потому что направление обсуждения во многом диктуется тем, применяется ли 1 М или 0,1 М раствор квадрола [3], используется ли полибрен совместно с охлаждаемой ловушкой или без нее. В большинстве слу-

чаев в зависимости от этих различий рабочие параметры анализа могут измениться почти на порядок (но не более). Кроме того, на результат определения влияет природа буфера (квадрол или N,N-диметилаллиламин, или сокращенно ДМАА).

13 лет назад, когда наша лаборатория занималась определением аминокислотной последовательности тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, для установления последовательности из 30—40 аминокислот обычно требовалось 10—20 мг образца. В настоящее время, применяя модифицированный прибор, 0,1 М квадрол, полибрен, охлаждаемую ловушку, мы регулярно проводим определение 60—80 остатков, загружая в прибор 1—2 мг образца (двукратное увеличение эффективности отщепления). Трудно точно указать причины такого улучшения результатов — вероятнее всего, проявляется взаимное влияние многих факторов.

Обычно мы готовим образцы к анализу на секвенаторе лиофилизацией их из воды, разбавленных растворов кислоты, летучих водных буферов. Образцы хранятся в закрытых сцинтилляционных баночках в виде белого пушистого порошка. В нашей практике бывали случаи, когда образцы, не имевшие такого внешнего вида, не удавалось анализировать. Причины подобных неудач не ясны, но, возможно, они связаны с нерастворимостью образца и наличием в нем примесей. Из-за трудностей идентификации остатков цистеина большинством обычных методов определения ФТГ-производных аминокислот почти всегда перед анализом последовательности мы восстанавливаем и карбоксиметилируем наши образцы радиоактивными реагентами. Поэтому небольшая аликвота каждого определяемого ФТГ-производного проверяется на наличие радиоактивности.

Образцы, содержащие соли, нельзя наносить в реактор секвенатора, так как это может привести к вымыванию всего образца. Это легко прослеживается при анализе радиоактивно меченных препаратов — в продуктах первых двух-трех циклов отщепления радиоактивность постоянно и сильно уменьшается, достигая в конце концов уровня фона. Поэтому следует избегать присутствия солей в реакторе секвенатора. В последние годы часто наносят образцы в присутствии ДСН. Хотя этот прием не получил очень широкого распространения в нашей лаборатории, наличие до 1% ДСН оказывается обычно полезным для растворения образцов, в особенности мембранных белков, выделенных из ДСН-гелей, без ущерба для последующего определения структуры белка.

В выборе наилучшего растворителя для нанесения образца в реактор нет единодушного мнения, и используемые систе-

мы растворителей меняются от лаборатории к лаборатории. По-видимому, этот вопрос никем не изучался систематически. Мы растворяем образцы в 25%-ной уксусной кислоте. Если они при этом не растворяются, то их нагревают до 80 °С в течение 10—30 мин с одновременным тщательным перемешиванием на вибромешалке. Если и такая обработка не помогает, то образец немедленно лиофилизируется и сохраняется в таком состоянии в течение 24 ч. На следующий день можно использовать два разных варианта растворения. Во-первых, можно попробовать растворить его в 1 М аммиаке. Многие белки растворяются при повышении pH среды, поэтому переход к 1 М аммиаку позволяет перевести в раствор около половины белков, не растворимых в 25%-ной уксусной кислоте. Если белок не растворяется в аммиаке, обычно он вновь лиофилизируется, а нанесение в секвенатор задерживается еще на 24 ч. Второй вариант, часто используемый в нашей лаборатории, заключается в растворении образца в концентрированной летучей органической кислоте (муравьиная или гептафтормасляная). Во многих лабораториях гептафтормасляную кислоту (ГФМК) регулярно используют для этой цели. Мы не применяем ее для растворения образцов из-за трудностей обращения с ГМФК, а также ее хранения и использования в качестве растворителя общего назначения. Однако можно применять кислоту, заливаемую в секвенатор, и тем самым исключить некоторые осложнения, связанные с хранением этого опасного реактива.

Белки, заведомо имеющие неблокированную N-концевую аминокислоту, но не поддающиеся анализу на секвенаторе, ведут себя так по разным причинам. Если в ходе восстановления и алкилирования (в гидрохлориде гуанидина или в мочевине) не было тщательного контроля pH (>7,0) и концентрации алкилирующего агента, то существует определенная вероятность реакции этого агента с N-концевой аминокислотой. Если это происходит, то белок оказывается «блокированным». Эта частная проблема становится бедствием, ибо не существует удобного способа удаления алкилирующей группы. Второе затруднение возникает, если белок нерастворим в одном или нескольких реагентах (растворителях). Мы обнаружили, что чаще всего это относится к квадрольному буферу. Часто, когда в присутствии квадрола было невозможно провести анализ, замена его на ДМАА-буфер позволяла получить отличные результаты.

После нанесения каждого образца, но до начала каждого анализа на приборе надо выполнить несколько операций. В нашей лаборатории проводят две таких операции. Первая — «высушивание образца» — заключается в попеременной продувке реактора аргоном и вакуумировании. Такая подготовка позволяет получить на стенке реактора тонкую, равномерно распре-

деленную сухую пленку образца. Эта операция автоматически проводится перед началом каждого анализа, но затем автоматически же исключается из общей программы анализа. После этого обычно проводится другая подготовительная операция — один полный цикл отщепления при отключенной подаче ФИТЦ в реактор (клапан подачи этого реагента R_1 в положении «off»). Это задерживает весь процесс определения не более чем на 10 мин после сушки образца, потому что сразу же после выполнения по программе команды «добавление R_1» можно включить клапан «добавление R_1» и далее весь процесс продолжается автоматически по полной обычной программе.

Программирование при помощи микропроцессора позволяет упростить выполнение этих операций. Мотивы для указанного «высушивания — вакуумирования» очевидны. Перед добавлением ФИТЦ и квадрола важно тщательно высушить образец и равномерно распределить его по поверхности реактора. Обычно образцы анализируются без добавления ФИТЦ в первом цикле отщепления для удаления (промывками) всех посторонних примесей, ясно детектируемых ВЭЖХ. Такая предварительная обработка образца служит дополнительным средством стандартизации условий нанесения образца в реактор и подготовки его к анализу.

15.3. Сравнение квадрола с летучими буферами

Со времени появления секвенатора квадрол оставался главной составной частью буферов. Он удовлетворял всем основным требованиям автоматического анализа, но обладал единственным недостатком — для его удаления необходима экстракция реакционной массы растворителями (например, этилацетатом), в которых растворяются некоторые пептиды. Во избежание этого в 70-е годы стали широко использовать летучие буферы на основе ДМАА, N,N-диметилбензиламина (ДМБА) и тому подобных аминов. И только после появления [3] в 1975 г. программы с применением 0,1 М квадрола предложения использовать небелковый носитель — полибрен — и введения в комплект прибора охлаждаемой ловушки буферы на основе квадрола снова оказались приемлемыми.

ДМАА имеет два очевидных преимущества. Во-первых, он лучше квадрола растворяет многие белки. Доказательством этого служат результаты сравнительного анализа многих белков. Во-вторых, летучесть ДМАА позволяет исключить промывку реакционной массы этилацетатом и ограничиться только промывкой бензолом.

Для уменьшения вымывания коротких пептидов при использовании квадрола в реактор вводят полибрен и применяют буферы с низкой концентрацией квадрола.

В табл. 15.1 приведены выходы С-концевой аминокислоты для пяти пептидов, аминокислотная последовательность которых анализировалась в различных условиях: с использованием квадрола или ДМАА, с добавлением или без добавления полибрена.

В графе *А* представлены результаты, полученные при использовании ДМАА по стандартной «пептидной» программе без каких-либо добавок; в графе *Б* — результаты анализа с добавлением полибрена. В обоих случаях

Таблица 15.1. Сравнение результатов анализа на секвенаторе с использованием 0,1 М квадрольного буфера, ДМАА-буфера в присутствии и в отсутствие полибрена

Пептиды	Выход[а], нмоль			
	А	*Б*	*В*	*Г*
Lys-содержащие пептиды				
TISK	2,7	7,1	0	4,5
GQLLPQEK	2,0	5,1	0	4,2
TLFAGLCVIK	2,6	5,1	0,25	5,0
Arg-содержащий пептид				
EQLNLR	2,9	5,8	2,0	4,7
Trp-содержащий пептид				
AGEEDCITSW	2,0	6,1	0,20	5,7

[а] *А* — ДМАА (без полибрена); *Б* — ДМАА (с полибреном); *В* — 0,1 М квадрол (без полибрена); *Г* — 0,1 М квадрол (с полибреном). Указан выход С-концевой аминокислоты пептида (наномоль) при загрузке в реактор секвенатора 10 нмоль каждого образца [13].

работа проводилась на одном и том же секвенаторе модели 890С. В графе *В* приведены данные, полученные на другом секвенаторе с использованием 0,1 М квадрола, в графе *Г* — с добавлением полибрена после нанесения пептида в реактор. В каждом случае анализировали 10 нмоль пептида. Определение ФТГ-производных аминокислот проводили методом ВЭЖХ. Как следует из приведенных данных, внесение полибрена положительно сказывается на анализе.

Существенное преимущество квадрола по сравнению с ДМАА состоит в более высоких постадийных выходах и в отсутствие артефакторов в разных системах идентификации. Квадрол меньше, чем ДМАА, загрязняет вакуумную систему и систему подачи реагентов.

Конструкция секвенатора модели 890С позволяет быстро переходить от одной буферной системы к другой.

От редактора. Для анализа на секвенаторе с вращающимся реактором первоначально требовалось 250 нмоль белка. В настоящее время можно анализировать 100 пмоль (при условии очистки квадрола перед использованием). Очистка уменьшает величину фоновых пиков и позволяет определять более длинные последовательности*.

Коммерческий препарат квадрольного буфера разбавляют до 0,1 М смесью пропанол-1 — вода (3 : 4). Добавляют 10 мг/мл β-N-(2-аминоэтил-3-аминопропил)стекла (фирма LKB) и мягко перемешивают в течение 24 ч при 20 °С для удаления следов альдегидов. После отстаивания частиц стекла отбирают буфер пипеткой. Добавляют 2 мг/мл ДИТЦ-β-N-(2-аминоэтил-3-аминопропил)стекла (LKB) к 0,1 М квадролу и мягко перемешивают в течение 4 сут при 20 °С. Хранят буфер над ДИТЦ-стеклом при 20 °С и отбирают его пипеткой по мере необходимости.

* ЖФ-анализ пептидов и белков на пикомольном уровне оказался непосильной задачей для большинства лабораторий. Реально для определения последовательности требуется не менее 1 нмоль образца, что явилось главной причиной вытеснения ЖФ-метода более чувствительным и экономичным ГФ-определением (табл. 17.1). — *Прим. перев.*

15.4. Полибрен

«Никто не знает, почему он работает, но он работает». Введение полибрена оказало глубокое влияние на автоматический анализ последовательности [12, 15]. Использованный вначале совместно с ДМАА полибрен в настоящее время широко используется и с 1 М квадролом, и с 0,1 М квадролом, и с буферами, содержащими 1 М и 0,1 М квадрол, в различных пропорциях. Его продает фирма Aldrich и в «очищенном» виде — фирма Pierce (марка «для секвенирования»). Описан ряд методик для дальнейшей очистки полибрена. По опыту нашей лаборатории, продукт фирмы Aldrich удовлетворяет требованиям анализа. Изучая возможности использования полибрена в сочетании с буферами на основе квадрола и ДМАА, мы загружали в реактор 0,3 мг, 3,0 мг, 30 мг и нашли, что доза в 3 мг является наилучшей. Недавние исследования указывают на то, что следует предпочитать пробы в 1 мг, хотя в некоторых лабораториях применяют навески до 10 мг. Примеси, присутствующие в полибрене, не обнаруживаются при хроматографии продуктов отщепления на секвенаторе, если до начала анализа провести один цикл без добавления ФИТЦ. Положение пиков на хроматограмме, соответствующих этим примесям, зависит от источника снабжения реактивами, растворителями и полибреном. Незначительные изменения состава растворителей для ВЭЖХ, свойств колонок разных фирм или даже разных колонок одной фирмы ведет к изменению положения артефактов на хроматограмме. От примесей можно избавиться одним из следующих способов:

1) очистить полибрен перед использованием;

2) нанести его в реактор без пептида (белка) или внести в реактор Gly-Gly, провести несколько циклов отщепления перед добавлением пептида (белка);

3) пептид и полибрен внести одновременно и провести один (или несколько) циклов промывки. Эта методика позволяет удалить большую часть примесей, присутствующих в полибрене. Пики примесей иногда появляются на хроматограммах первых двух-трех циклов отщепления, но они легко отличаются от пиков фона аминокислот тем, что резко уменьшаются в размерах в течение первых трех циклов отщепления.

Полибрен можно долго хранить, тем не менее использование образца, простоявшего при комнатной температуре более недели, часто приводит к недостоверным результатам определения структуры. Поэтому следует ежедневно готовить свежий раствор полибрена или хранить такой раствор при 4 °C не более недели. Можно растворить полибрен в воде (30 мг/мл) и хранить раствор в морозильной камере холодильника.

При использовании полибрена в работе на секвенаторе фирмы Beckman не обнаружено вредного воздействия его ни на систему клапанов, ни на систему идентификации. В лаборатории авторов анализировалось >20 000 образцов ФТГ-производных аминокислот методом ВЭЖХ и (или) обратного кислотного гидролиза с последующим определением аминокислот на анализаторе D-500 фирмы Durrum без вредного воздействия на аппаратуру.

15.5. Реагенты и растворители

В автоматическом анализе последовательности наиболее дорогостоящая статья эксплуатационных расходов приходится на реактивы. На обеспечение ими каждого секвенатора в течение одного года требуется ~15 000 долл. США. В печати и в лабораториях все время дискутируется вопрос об источниках снабжения реактивами. Мнения сильно расходятся; одни утверждают, что необходимо окончательную очистку всех реактивов проводить потребителем [1, 11], другие предлагают производить закупку наиболее де-

шевых коммерческих партий с последующим их испытанием каждым потребителем. Мнение большинства находится где-то между этими двумя крайними точками зрения. В нашей лаборатории используются несколько разных источников снабжения, и наша стратегия заключается в следующем.

Мы покупаем все реактивы у фирмы Beckman. Из всех доступных ранее «секвенаторных» реактивов продукция этой фирмы — самая дорогая, но реактивы только этой фирмы имеют гарантию проверки на секвенаторе. Поскольку каждый из реактивов по отдельности проверен на секвенаторе и все реактивы имеют наименьшие изменения качества от партии к партии, то при работе с ними меньше всего шансов на неудачи в анализе структуры.

Однако их высокая стоимость толкнула многих (в том числе и нас) на поиск других источников снабжения. В целом наш опыт говорит о том, что реактивы фирмы Pierce хорошего, но непостоянного качества, ключевым реагентом является ГФМК и, по нашему мнению, большая часть описанных в литературе изменений постадийных выходов возникает именно из-за непостоянства качества ГМФК. Доказано, что коммерческие препараты «безводной» ГМФК содержат воду, описана методика дальнейшей осушки кислоты [1]. По нашему мнению, в целом это бесполезно, и мы не обнаружили особых преимуществ при снижении содержания воды с 30 до 4—6 $млн^{-1}$.

Значительная экономия достигается при покупке растворителей не у фирмы Beckman, а у других фирм. У нас никогда не возникало никаких затруднений при использовании бензола из разных источников, хотя нашим постоянным поставщиком является фирма Burdick and Jackson. Некоторые проблемы могут быть связаны с применением разных партий этилацетата, так как многие партии этого растворителя содержат примеси, разрушающие ФТГ-производные аминокислот.

Мы рекомендуем простой тест для этилацетата. Надо взять стандартное количество ФТГ-производных аминокислот (мы обычно используем наши стандарты, предназначенные для ГЖХ или для ВЭЖХ), смешать их с 1,5 мл этилацетата из испытуемой партии и оставить при комнатной температуре на 30 мин, затем высушить в потоке азота. Остаток затем анализировать количественно методом ГЖХ или ВЭЖХ, измеряя высоты пиков. Растворение в этилацетате либо не влияет на высоту пиков ФТГ-производных аминокислот, либо разрушает эти производные полностью, и в результате не обнаруживается никаких пиков.

Изредка попадались партии растворителя, дававшие промежуточные результаты. При проведении этого простого теста как для относительно дешевого этилацетата (Burdick and Jackson), так и для умеренно дорогого (Pierce) получены хорошие результаты.

Добавление различных протекторов в реагенты и растворители в последние годы практикуется реже, чем ранее (например, внесение соляной и аскорбиновой кислот). Не так часто, как ранее, применяется добавление восстановителей в хлоробутан, особенно если для анализа производных Ser и Thr используется метод ВЭЖХ*.

Для очистки реактивов необходимо иметь перегонные аппараты. Дистилляционные установки с вращающейся мешалкой стоят около 4000—10 000 долл. США (B/R Instrument Corp.).

---

* Добавление дитиотреита во все реагенты и растворители, используемые на стадиях отщепления тиазолинонов и превращения последних в ФТГ, в настоящее время считается обязательным для проведения высокочувствительного анализа. — *Прим. перев.*

15.6. Основные проблемы, возникающие при использовании автоматического секвенатора

15.6.1. Вакуумная система

Большая часть затруднений при автоматическом определении структуры пептидов и белков связана с неполадками вакуумной системы. Устранение утечек в этой системе и поддержание необходимого вакуума занимает большую часть рабочего времени оператора и инженера, обслуживающих прибор. При ликвидации утечки необходимо прежде всего найти и изолировать участок разгерметизации. Эта работа включает набор приемов, позволяющих оператору определить конкретную часть прибора, в которой произошла утечка: реактор, линия, соединяющая реактор и гребенку-распределитель линии низкого вакуума, участок между гребенкой и вакуумным насосом.

В большинстве случаев наличие утечки обнаруживается после замыкания всей линии низкого вакуума на реактор. Обычно это помогает определить, является ли реактор причиной неполадки. При отрицательном заключении следует проводить поиск от реактора к насосу, а не наоборот.

15.6.1.1. Утечка вакуума в реакторе. При разгерметизации реактора существуют два источника утечек. Во-первых, это линии подачи реагентов, трещины в мембранах, неправильное размещение соединительных линий. Это наиболее частые причины значительного ухудшения вакуума. Во-вторых, утечки (хотя и гораздо реже) могут появиться в линиях отбора растворителей из реактора и в линиях продувки реактора азотом. Наконец, надо тщательно проверить прокладочные кольца на наличие искривлений, разрывов и чрезмерного разбухания.

15.6.1.2. Утечки в гребенке линии низкого вакуума. От гребенки отходят три линии: одна — к источнику балластного азота, вторая — к клапанам, третья — к соленоидному клапану низкого вакуума. Следует поочередно перекрыть каждую из этих линий и проверить вакуум в системе. Мы обычно используем резиновую пробку, покрытую смазкой. Если разгерметизация обнаружена в линии, идущей к клапану балластного азота, то утечка обычно обусловлена поломкой трехходового азотного клапана, соединенного с гребенкой для распределения азота. Этот дефект особенно часто обнаруживается на приборах, интенсивно работающих по программам с использованием ДМАА. Второй причиной ухудшения вакуума часто бывает слишком большое «отпирающее» давление азота в линии управления клапанами, из-за чего клапан постоянно открыт. Если утечка прослеживается до самого клапана подачи реактивов, то это означает, что лопнула одна из диафрагм клапана. Эту поломку обычно обнаруживают только опытные инженеры. Однако чаще всего утечка прослеживается до соленоидного клапана низкого давления; это случается на приборах, на которых длительно проводилась работа с ДМАА. Соленоидный клапан низкого давления следует регулярно заменять.

15.6.1.3. Утечка между насосом и гребенкой низкого вакуума. Диагностику таких повреждений проводят, отсоединив линию, ведущую к гребенке низкого вакуума и закрыв ее резиновой пробкой, покрытой смазкой. В этом отсеке вакуум должен быть $\leqslant 50$ мм рт. ст.; если это условие не соблюдается, то либо существует утечка между гребенкой и насосом, либо ремонта или замены требует сам насос. Замены можно избежать, проверив вакуум на самом насосе. Разумеется, следует заменить масло в насосе, оба вакуумных датчика, линии, соединяющие датчики с насосом, и соединения между гребенкой и насосом.

15.6.2. Утечки в вакуумной линии в системе с одним насосом

При этой схеме насос низкого вакуума используется только для активации клапанов подачи реагентов и для вакуумирования коллектора, и поэтому он не доставляет больших хлопот. Наш насос работал нормально более двух лет даже без смены масла! Однако система высокого вакуума, по нашему опыту, может быть источником трудно определяемых утечек, хотя и более редких, чем в схеме с двумя насосами. При наличии крана перед входом в охлаждаемую ловушку легко проверить наличие утечки до и после ловушки. Этот прием особенно полезен, так как многие осложнения, вызываемые, казалось бы, утечкой вакуума в приборе, в действительности зависят от работы ловушки.

Проверив вакуум при закрытом кране, закрывают выход из ловушки большой резиновой пробкой, покрытой вакуумной смазкой, и открывают кран. Утечки в ловушке возникают либо в сливной линии либо в местах плохой герметизации выводов ловушки. Полное размораживание ловушки и герметизация выхлопной линии обычно устраняют проблему (временно). Лучшим решением было бы изменение конструкции узла слива. Разгерметизация выводов устраняется повторным смазыванием кольцевых прокладок или их заменой.

По нашему опыту, утечки вакуума между охлаждаемой ловушкой и реактором маловероятны; ни соленоидные клапаны, ни клапан воздушного цилиндра не были источником серьезных затруднений.

15.6.3. Программирующее устройство

Оператору трудно обнаружить неполадки в работе программирующего устройства. Для замены вышедших из строя деталей и узлов необходимо участие специалиста. Источником многих сбоев, трудных для обнаружения, но легко устранимых, являются счетчики (фирмы Veeder-Rooder). Отказы в работе (залипание контактов) подтверждаются срабатыванием автоматической блокировки при добавлении реагентов по истечении контрольного срока, заведомо большего, чем время добавления реагентов. Если это происходит при работе секвенатора в автоматическом режиме, срабатывают блокировки и процесс останавливается. По нашему опыту, большая часть случаев автоблокировки прибора вызывается именно отказами в работе счетчиков указанного типа. При обнаружении этой причины остановки процесса простая замена счетчика снимает проблему. Другие неполадки, вносимые программирующим устройством, связаны со щетками; для их замены требуется участие специалиста. Во многих лабораториях пренебрегают профилактической очисткой программирующего устройства, в частности не проводится своевременная чистка его головки, хотя это важное условие нормальной работы секвенатора.

15.6.4. Реле

Вся электроника секвенатора чрезвычайно надежна, за исключением реле. Существует несколько простых приемов поиска причин отказов реле. Первый — срабатывание автоблокировки подачи реагентов. Хотя чаще всего это связано с отказом таймера подачи реагентов, но и отказы реле могут быть причиной срабатывания блокировки. Второй причиной является поломка реле, управляющего передвижением круга коллектора фракций. Во всех случаях единственный разумный выход — замена реле на новые.

15.6.5. Клапаны

Клапаны подачи реагентов и растворителей, используемые в модели 890С, являются объектом оживленных споров. Недостатки этих клапанов послужили причиной их модернизации во многих лабораториях по методу Виттман-Либольд. При постоянном контроле за эффективностью работы прибора снижение постадийного выхода — достоверный сигнал неисправности клапанов. Наиболее часто причина снижения эффективности процесса связана с растрескиванием мембраны. Поломки диафрагм клапанов хорошо известны любому обладателю секвенатора, однако мало кто знает о простых приемах проверки качества диафрагм. В нашей лаборатории проверка проводится напуском вакуума в реактор секвенатора и слежением за наличием реагентов в линиях подачи, идущих от клапанов, находящихся в закрытом положении. Каждая подающая линия поочередно заполняется «своим» реагентом (растворителем). Последующее включение вакуума вытягивает жидкость из линии, которая должна выглядеть совершенно сухой. В ходе вакуумных сушек, проводимых после каждой стадии цикла (присоединение ФИТЦ, отщепление АТЗ, экстракции), не должно быть никаких утечек, особенно в линиях подачи реагентов, так как это может сильно повредить проведению процесса. При появлении трещин или других нарушений поверхности контакта клапанов также появляется течь.

Клапан переключения потока («коллектор — слив») редко является причиной осложнений в работе, если только не используется автоматический коллектор. На секвенаторе часты отказы многих соленоидных клапанов (разбухание или залипание уплотнительных прокладок), что приводит к прекращению подачи реагентов. Для восстановления работоспособности клапанов необходима частая замена сношенных частей запасными.

15.7. Контроль качества работы прибора

Успешная работа прибора зависит от внимания оператора к частностям процесса, от предотвращения или раннего обнаружения неполадок. Прежде всего перед началом каждого анализа надо убедиться в достижении требуемого значения вакуума во всей системе (путем включения реактора), в отсутствии протечек жидкостей через клапаны подачи реагентов (растворителей). Следует проверить количество реагентов и растворителей в бутылях и степень герметизации самих бутылей. Удивительно то, что во многих лабораториях пренебрегают соблюдением этих простых правил. Используя секвенаторы в нашей лаборатории почти 13 лет, мы регулярно (еженедельно) анализируем миоглобин на каждом приборе. Это может показаться излишеством, но в действительности только так можно своевременно обнаружить ухудшение работы каждого прибора. Кроме того, практически каждый анализ радиоактивно меченных образцов проводится с использованием внутреннего стандарта ([^{35}S]иммуноглобулина, продуцируемого плазмацитомой МОРС21). Уникальность препарата заключается в том, что МОРС21 выращивается на среде, содержащей [^{35}S]Met. Из надосадочной жидкости этой культуры после диализа и разделения в восстанавливающих условиях в ПААГ получают белки (две полосы в геле, содержащие радиоактивность), соответствующие тяжелой и легкой цепям иммуноглобулина. Легкая цепь содержит остатки [^{35}S]Met в положениях 4, 11, 13, тогда как в тяжелой цепи первый остаток [^{35}S]Met находится в положении 34. Поэтому для большинства целей сама диализированная надосадочная жидкость может служить внутренним стандартом. Для более точной количественной оценки работоспособности секвенатора можно разделить цепи в ДСН — ПААГ или на сефадексе и нанести легкую цепь в реактор прибора. Этот прием идеален с нескольких точек зрения. Во-первых, можно точно определить постадийный выход на основе данных 4, 11, 13-го циклов отщепле-

ния. Во-вторых, сам процесс отщепления можно провести в течение ночи. В наших условиях выходы составляют 92—97% и практически всегда совпадают с результатами анализа миоглобина. В-третьих, можно смешать миоглобин с меченой легкой цепью, провести 12 циклов отщепления (Val-Leu-Ser-Glu-Gly-Glu-Trp-Gln-Leu-Val-Leu-His-Val-Trp→) и продукты отщепления циклов 1, 2, 10, 11 анализировать методом ГЖХ и ВЭЖХ, а циклов 4, 11, 13 — оценить на содержание радиоактивности. При расхождении постадийных выходов для этих двух стандартов (обычно выходы для миоглобина ниже, чем для меченой легкой цепи) причиной этого расхождения чаще всего является неэффективная работа системы превращения ТА в ФТГ-производные аминокислот (плохое качество этилацетата, перегрев конвертора, загрязнения в системе продувки азотом, перегрев испарителя и т. д.)

В нашей лаборатории используются еще два способа контроля состояния прибора. Оба они заключаются в постоянной записи температуры в ходе всего опыта. Подключение недорогого самописца к датчику температуры реактора дает оператору ту же информацию, что и кардиограмма кардиологу. Этим путем можно достоверно контролировать включение — выключение клапанов, подачу и отбор реагентов, растворителей, эффективность вакуумирования. Таким же образом мы контролируем температуру в охлаждаемых ловушках. Температура ловушки — мера эффективности ее работы, а поэтому и мера эффективности всего процесса. Датчики присоединены к главному блоку управления; изменение температуры фиксируется на ленте самописца. Вместе с тем регистрация температуры ловушки позволяет следить за степенью заполнения криогенной системы для своевременного размораживания ее. На необходимость размораживания указывает и быстрое падение эффективности вакуумирования. В условиях влажного климата серьезную проблему представляет конденсация паров влаги воздуха на поверхности ловушки во время работы и во время размораживания. Баня с охлажденными этанолом разбавляется водой, что ведет к значительному повышению температуры внутри охлаждающего пальца и, далее, к неэффективному вымораживанию растворителей и реагентов. В этом случае слежение за температурой позволяет своевременно устранить недостатки в работе системы охлаждения.

От редактора. Данные о последовательностях могут быть получены по следующим адресам:

Для нуклеиновых кислот:

Genbank, 10, Moulton Street, Cambridge, MA 02238, U.S.A.

EMBL Nucleotide Sequence Data Library, EMBL, Postfach 10 22 09, D-6900 Heidelberg, West Germany.

Для белков:

Protein Sequence Database, National Biomedical Research Foundation, Georgetown University Medical Center, 3900 Reservoir Road, N.W., Washington, DC 20007, U.S.A.

Professor R. F. Doolitle, Department of Chemistry, University of California, San Diego, La Jolla, California, U.S.A. 92093.

Адреса любезно представлены д-ром Р. Стаденом (Rodger Staden).

Литература

1. *Begg G. S., Pepper D. S., Chesterman C. N., Morgan F. J.*, Biochemistry, **17**, 1739—1744 (1978).
2. *Begg G. S., Leslie B. H., Morgan F. J.*, Anal. Biochem., **138**, 30—33 (1984).
3. *Brauer A. W., Margolies M. N., Haber E.*, Biochemistry, **14**, 3029—3035 (1975).
4. *Croft L. R.*, Handbook of Protein Sequence Analysis, 2nd edn., Wiley, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1980.

5. *Dayhoff M. O.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, 1972.
6. *Dayhoff M. O.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, suppl. 1, National Biomedical Research Foundation, Washington, 1973.
7. *Dayhoff M. O.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, suppl 2, National Biomedical Research Foundation, Washington, 1976.
8. *Dayhoff M. O.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, suppl. 3, National Biomedical Research Foundation, Washington, 1978.
9. *Edman P., Begg G.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80—91 (1967).
10. *Hermodson M. A., Ericsson L. H., Titani K., Neurath H., Walsh K. A.*, Biochemistry, **11**, 4493—4502 (1972).
11. *Hunkapiller M. W., Hood L. W.*, Biochemistry, **17**, 2124—2133 (1978).
12. *Klapper D. G., Wilde C. E., Capra J. D.*, Anal. Biochem., **85**, 126—131 (1978).
13. *McCumber L. J., Qadeer M., Capra J. D.*, In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, Proc. Third Internat. Conf., Birr C. (Ed.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 165—172 (1980).
14. *Niall H. D.*, Methods Enzymol., **27**, 942—1010 (1973).
15. *Tarr G. E., Beecher J. F., Bell M., McKean D.*, Anal. Biochem., **84**, 622—627 (1978).
16. *Waterfield M., Bridgen J.*, In: Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis, Perham R. N. (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco, pp. 41—47 (1975).

Глава 16

НОВЕЙШИЕ МЕТОДЫ ТВЕРДОФАЗНОГО И ЖИДКОФАЗНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Дж. К. ИНМАН (J. K. INMAN, *Laboratory of Immunology, National Institute of Allergy and Infections Diseases, National Institutes of Health. Bethesda, Maryland 20205, U.S.A.*), Э. АППЕЛЛА (E. APPELLA, *Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20205, U.S.A.*)

16.1 Введение

Многие годы не прекращается поток публикаций о новых подходах к определению аминокислотной последовательности и предложений об усовершенствовании существующей методологии. Неискушенному и часто располагающему очень ограниченным временем исследователю — не специалисту в этой узкой области, обычно трудно оценить, является ли новая методика завершенной разработкой, готовой к тиражированию, или это всего лишь заманчивая, но «сырая» идея, по мере внедрения которой выясняется, что она требует значительной доработки. Авторы большинства приоритетных публикаций по понятным причинам полны энтузиазма и склонны к преувеличению достоинства своих разработок. В данной главе излагаются наши соображения о новейших методиках и идеях; мы надеемся, что этот обзор поможет новичкам избежать разочарований и будет полезен более опытным исследователям, испытывающим особенно острую потребность в конкретных методах, реальная отдача которых еще не очевидна. Дополнительно указаны наши специфические требованиня к слабо разработанным методикам и к нарождающимся идеям с целью стимулировать новаторские исследования в методологии.

16.2. Твердофазный анализ. Новейшие подходы

16.2.1. Общие замечания

Большие успехи в применении нерастворимых носителей для твердофазного (ТФ) синтеза пептидов [72] стимулировали разработку метода анализа аминокислотной последовательности пептидов, ковалентно присоединенных к нерастворимым полимерам [61]. Впоследствии метод ТФ-анализа структуры пептидов удалось автоматизировать [62]. Общая особенность методов синтеза («сборки») и анализа аминокислотной последова-

тельности состоит в многократном повторении определенного набора химических реакций. Для получения высокого суммарного выхода в результате последовательного присоединения (или отщепления) многих аминокислот каждая отдельная реакция каждого цикла синтеза (или анализа) должна протекать с высоким выходом. Для смещения равновесия реакции используется избыток реагентов, поэтому в ходе процесса возникает задача отделения целевых промежуточных продуктов от избытка реагентов и побочных продуктов реакции. Проведение этого процесса в растворе требует больших затрат времени и реактивов. Разделение компонентов можно провести гораздо быстрее и экономичнее, используя принцип фильтрации или экстракции в гетерогенной системе жидкая фаза — твердая фаза. В настоящее время разработано много вариантов проведения высокоэффективных реакций в гетерогенных системах, в частности ТФ-анализ аминокислотной последовательности белков, широко применяемый и на практике дополняющий жидкофазный метод. ТФ-метод обладает следующими достоинствами:

1) реакционную массу можно тщательно промывать практически любыми растворителями без потери пептида;

2) для присоединения пептидов к носителю используется широкий набор реагентов и растворителей без ограничений по летучести или экстрагируемости, а использование больших избытков реагентов не вызывает больших осложнений при удалении последних;

3) постоянно образующиеся побочные продукты реакции непрерывно удаляются потоком проходящей жидкости, что сводит к минимуму их взаимодействие с пептидом или носителем;

4) можно проводить (до или после присоединения пептида или между отдельными стадиями ТФ-анализа) специфическое расщепление молекулы по внутренним остаткам пептидной цепи [43, 64, 65].

В данной главе не будут обсуждаться известные положения ТФ-подхода, поскольку основные его принципы читатель может найти в сборниках трудов первых четырех международных конференций, посвященных анализу структуры белка [13, 33, 63, 82] и в обзорах [65, 77], а также в данном сборнике (гл. 12).

Метод позволяет определять последовательность аминокислот, расходуя менее 10 нмоль образца. Для уверенной работы на уровне <1 нмоль необходимо коренное усовершенствование методологии, в том числе разработка высокочувствительной идентификации отщепляемых производных аминокислот. В этом отношении, в частности, очень велики возможности масс-спектрометрии. Следует отметить, что при повышении чув-

ствительности детектирующих систем достоверность получаемой информации ограничена отношением величины сигнала к шуму, который определяется уровнем химического фона. В принципе ТФ-анализ позволяет получить чрезвычайно низкий уровень фона, но для этого следует пересмотреть многие аспекты химии процесса и конструкции прибора.

При работе с количеством образца <1 нмоль уровень фона может быть снижен прежде всего благодаря уменьшению навесок носителя (до нескольких миллиграммов и менее), а также путем миниатюризации всех элементов прибора (минимальная площадь загрязняющих поверхностей). Отдельные узлы и общая схема автоматических секвенаторов до сих пор основываются на старых идеях и включают многие комплектующие детали, которые использовались в установках для полуавтоматического анализа, что ограничивает возможности работы на микро- и ультрамикроуровне. В частности, для управления подачей реагентов лучше использовать не механические, а гидравлические устройства.

Наибольшее внимание следует уделять разработке химических аспектов метода; в этом отношении большие методические возможности и гибкость ТФ-анализа до сих пор мало используются. Для повышения чувствительности анализа необходимо добиваться снижения уровня химического фона и повышения эффективности отщепления аминокислот (выход как в первом цикле отщепления, так и постадийные выходы в последующих циклах). На основе более глубокого понимания всех проходящих химических реакций (как основных, так и побочных) необходимо систематически пересматривать условия проведения реакции Эдмана и разрабатывать другие методы отщепления.

В последующем обсуждении выражено лишь наше частное мнение относительно перспективности химических разработок в области методологии ТФ-анализа. При этом мы не предпринимали попыток всестороннего анализа появляющихся время от времени новых подходов.

16.2.2. Носители

Твердофазные определения проводят почти исключительно на пептидах, ковалентно присоединенных к модифицированным матрицам одного из трех типов:

1) полистирол (1% поперечной сшивки дивинилбензолом);
2) пористое стекло;
3) производные полиакриламида.

Описаны методы получения и свойства этих носителей [70].

Идеальная матрица, предназначенная для иммобилизации пептидов, должна обладать следующими свойствами:

1) низким сопротивлением потоку в колонке, что обеспечивается как высокой механической прочностью частиц, так и минимальным изменением объема носителя в колонке в течение всего цикла отщепления;

2) химической стойкостью;

3) высоким значением удельной поверхности, легко доступной окружающей жидкости;

4) химической емкостью поверхности частиц сорбента, достаточной для эффективного присоединения пептида;

5) кинетические условия реакций пептидил-носителя должны приближаться к кинетике реакций в растворе.

Ни один из известных сегодня носителей не удовлетворяет одновременно всем вышеупомянутым критериям. Слабосшитые полистирол и полиакриламид должны предварительно хорошо набухнуть в растворителе для того, чтобы функциональные группы носителя или пептида, присоединенного к носителю, были доступны для реагентов. Поэтому при работе с такими сорбентами очень важен выбор растворителей. При смене растворителей часто происходит «усадка» или разбухание этих гелеобразных полимеров, что ведет к образованию каналов или же «запиранию» колонки. Для предотвращения этих явлений частицы пептидил-полимера тщательно смешивают с гораздо большими объемами маленьких стеклянных шариков. Однако увеличение общего объема реакционной массы требует применения большего расхода реагентов и промывающих растворителей, ведет к сорбции реагентов и побочных продуктов реакции. Соответственно возрастает уровень фона в анализируемых образцах, что может стать серьезным препятствием для анализа на микроуровне.

В противоположность этому пористые стекла обладают жесткой структурой и не вносят упомянутых проблем. Поэтому при работе с ними можно применять широкий набор растворителей без риска появления в колонке высокого давления (при условии, что в ходе присоединения пептида удалось избежать механического повреждения хрупких частиц, так как размол крупных частиц до мелких приводит к созданию больших противодавлений при последующей работе колонки).

К сожалению, стекло до некоторой степени растворяется в щелочной среде, поэтому не следует использовать растворы, имеющие $pH > 8{,}5 \div 9{,}0$.

Несмотря на недостатки, присущие носителям на основе стекла, применение последних позволяет успешно проводить определение последовательности.

Низкосшитый полистирол является неудачной матрицей для пришивки белков и очень больших пептидов. Часто встречающаяся несовместимость растворителей и пептидов (или матри-

цы) приводит к изменениям структуры пептидилносителя, неблагоприятным для доступа реагентов к N-концевым аминогруппам. Для решения этой проблемы применяли матрицу на основе полиакриловой кислоты, амидированной сульфонированным *п*-фенилендиамином [20]. Полученные при дальнейшей модификации полимера изотиоцианатные группы используют для присоединения белка, а соседние ионы сульфоната создают местное гидрофильное окружение, необходимое для совместимости с растворителями.

Все обычно применяемые носители имеют элементы структуры, вносящие свой вклад в создание химического фона, и поэтому для снижения уровня фона необходима химическая модификация носителя, Поскольку постадийные выходы редко превышают 95%, то, очевидно, эти структуры вносят существенный вклад в неидеальную кинетику реакций.

Дальнейшие успехи в создании носителей зависят от уровня понимания природы химических реакций в многофазных системах. Необходимо отказаться от представления о том, что твердый носитель представляет собой инертную «стенку», к которой прикреплен пептид. Исследования в области твердофазного синтеза пептидов в настоящее время опираются на концепцию динамической системы носитель — пептид — растворитель, подчиняющейся различным правилам кинетики и термодинамики [35]. Неидеальная кинетика реакции зависит не столько от замедленной диффузии или массопереноса внутрь гранулы, сколько от плохой сольватации пептида и матрицы носителя [39]. Возможно, на сольватацию существенно влияет локальное расслаивание внутри фаз. В определенном микроокружении пептид и матрица могут взаимодействовать настолько сильно, что это взаимодействие становится равнозначным осаждению, приводящему к выводу вещества из реакции.

В других случаях происходит распределение реагентов в системе жидкость — жидкость. По этой причине концентрация реагента в микроокружении N-концевой части пептида особенно мала. Этой проблемы легко избежать, используя систему с одним растворителем [80]. Местные перераспределения, происходящие по любому из вышеупомянутых механизмов, возникают в ходе последовательного отщепления и вызывают временное или постоянное снижение реакционной способности отдельных цепей. Этот недостаток усиливается при наличии заведомых негомогенностей в структуре матрицы (неравномерное распределение поперечных сшивок и т. д.). В результате химической модификации пористого стекла образуется поверхность, покрытая тонкой пленкой поперечно-сшитого силоксанового полимера, а не цепь, присоединенная к сорбенту в одной точке. Поэтому в случае носителей на основе стекла должны сущест-

вовать те же местные «барьеры» для реакций, что и в гелевых структурах полимеров.

Есть несколько сообщений о получении, свойствах и использовании в твердофазном пептидном синтезе акриловых сополимеров, состоящих главным образом из поли-N,N-диметилакриламида [23, 95, 96] или поли-N-акрилпирролидона [93, 97]. Эти полимеры совместимы с гораздо большим числом полярных и умеренно полярных растворителей (и, по-видимому, также с присоединенными пептидами), чем полиакриламидные или полистирольные носители. Поэтому представляется заманчивым использовать указанные полимеры в качестве носителей для ТФ-анализа пептидов. Выбирая носитель, мы ориентируемся прежде всего на жесткую конструкцию матрицы, что позволяет избежать серьезных осложнений, связанных с разбуханием сорбента и блокированием колонки. Для того чтобы можно было проводить реакцию присоединения ФИТЦ в сильнощелочной среде, мы выбрали вместо стеклянных носителей макропористый полистирол. Дополнительное достоинство полистирола состоит в том, что на нем можно устойчиво и воспроизводимо проводить многочисленные реакции химической модификации. Выяснилось, что эта жесткая, сильносшитая матрица тем не менее обладает некоторой гибкостью на молекулярном уровне и обеспечивает большой набор микроокружений (включая неблагоприятные) в структуре гидрофобных поверхностей.

Нашей первой целью было введение «вставок» («ножек»), выступающих из поверхности с функциональными аминогруппами, необходимыми для последующего присоединения пептидов. Если «вставки» являются полимерами необходимого размера и состава, то они могут служить также сорастворителями и содействовать образованию отделенной от матрицы фазы, в которой совместимы пептид и используемые растворители. В принципе можно найти условия, позволяющие обеспечить и необходимую степень сольватации всех пептидных цепей и требуемую степень взаимодействия последних с реагентами. В качестве пространственно модифицирующего полимера был выбран полиэтиленгликоль, найденный опытным путем как сорастворитель при ТФ-анализе [87, 88]. Успешно проведен пептидный синтез с последовательным наращиванием пептидной цепи, присоединенной к концам цепей полиэтиленгликоля [79]. При этом кинетика присоединения схожа с наблюдавшейся в свободном растворе [9].

Производные макропористого полистирола были синтезированы по методике, подробно описанной в работе [51]. Сообщалось о предварительных результатах анализа последовательности [1].

Обнаружено, что эти носители хорошо проницаемы для растворителей и обладают низким уровнем фона примесей. Однако в ходе последующего сравнительного расщепления по Эдману пептидов, присоединенных к коротким вставкам, и тех же пептидов, «пришитых» к небольшим цепям полиэтиленгликоля (содержащим до 13 оксиэтиленовых звеньев), не было обнаружено значительных различий ни в начальных, ни в постадийных выходах ФТГ-производных аминокислот. Мы пришли к выводу, что в данном случае для создания эффекта сорастворения или предотвращения сильных взаимодействий полистирол — пептид необходимо увеличение либо навески образца, либо молекулярной массы модифицированного полимера.

В заключение следует отметить, что вероятным идеальным носителем может быть такой привитой сополимер, в котором один компонент служит жестким каркасом, поддерживающим структуру второго сополимера, к которому ковалентно присоединен пептид. Полимер с жестким каркасом из-за сложностей, вызываемых характером его поверхности, сам по себе был бы ненадежным «якорем» для конденсации с пептидом. Второй компонент следует выбирать с учетом его совместимости с различными растворителями и реагентами, используемыми как для присоединения пептида, так и для определения строения последнего. Сам по себе этот сольватируемый полимер из-за своей совместимости с растворителями и доступности внутренней структуры был бы по механическим свойствам непригоден для использования в колонке. Суммируя вкратце вышеизложенное, следует сказать, что упомянутая макропористая система с жестким каркасом является пелликулярной конструкцией, успешное использование которой зависит от правильного выбора привитого сольватируемого полимера.

16.2.3. Присоединение пептидов к носителям и «забивка» оставшихся реакционных центров носителя

ТФ-подход порождает свои проблемы, возникающие из необходимости фиксировать пептид на носителе (обычно при помощи ковалентных связей). Хотя пептиды можно связать и адсорбционными силами, такая иммобилизация не надежна, так как жидкофазное элюирование, происходящее минимум один раз в каждом цикле отщепления аминокислоты, может привести к вымыванию и потере пептида. Для надежной адсорбции необходим тщательный подбор хорошо сочетающихся между собой пептидных образцов и адсорбирующих поверхностей. При множественных и очень прочных адсорбционных связях затрудняется сольватация и понижается подвижность пептидов и тем самым ухудшается кинетика реакции (разд. 16.2.2 — об-

суждение носителей). С учетом этих потенциальных недостатков был разработан и успешно использован в миниатюризованном секвенаторе носитель, представляющий собой стекловолокнистый диск, покрытый полибреном [42]. Исследуемый образец адсорбируется на диске (гл. 17). Сообщается об успешном использовании такого носителя при изучении структуры большого числа пептидов и белков (определена последовательность, включающая >30 остатков).

Потеря пептидов сводится к минимуму вследствие их сорбции на большой площади поверхности носителя и использования наиболее полярных реагентов (триметиламин и ТФУ) в газообразном состоянии.

При проведении ковалентного присоединения возникают многочисленные осложнения. Кроме того, не существует удовлетворительного общего способа присоединения пептидов исключительно по их С-концевым остаткам.

В особых случаях можно использовать несколько отлично зарекомендовавших себя вариантов присоединения по α-карбоксилу, широко применяющихся на практике. Эти частные приемы присоединения, а также несколько общих методов конденсации, но не по концевым аминокислотам, обсуждались в работах [64, 106], а также в данной книге (гл. 12).

Прямое присоединение пептидов к носителю происходит по бимолекулярному механизму. При конденсации очень малых количеств пептида высокий выход реакции возможен только при очень высокой эффективной концентрации нуклеофильных групп носителя (обычно это аминогруппы). Поскольку последние присутствуют в большом молекулярном избытке, то кинетически возможна реакция псевдопервого порядка. Однако концентрация аминогрупп пептида мала, и поэтому не требуется их защита в ходе присоединения (за исключением особых случаев [64]). Аминогруппы следует блокировать в тех случаях, когда перед добавлением носителя пептид предварительно активируется. При одностадийных присоединениях редко нужна защита N-концевых групп. Если же она все-таки необходима, то при помощи 2-*трет*-бутилоксикарбонилоксиимино-2-фенилацетонитрила [1] вводят 2-*трет*-бутилоксикарбонил (БОК) группу [1]. Аналогичная защита аминогруппы нужна и перед активацией карбоксильных групп карбодиимидом при конденсации по С-концевому карбоксилу [85], когда при последующей инкубации в щелочных условиях карбоксильные функции боковых цепей аминокислот превращаются в стабильные N-ацилмочевины, а часть активированных С-концевых аминокислот — в реакционноспособные оксазолиноны.

При обычных условиях активация пептида карбодиимидами приводит к конденсации его с носителем через карбоксильные

группы боковых цепей пептида. В ходе дальнейшего определения последовательности аминокислот могут возникнуть пропуски последовательности в тех местах, где остатки карбоксилсодержащих аминокислот количественно присоединены к носителю за карбоксильные группы боковых цепей. Если данные остатки не являются последними в цепи и за ними существуют другие точки присоединения к носителю, то определение структуры пептида можно продолжить. При конденсации в мягких условиях сохраняются свободные боковые карбоксильные группы некоторых внутренних остатков Asp или Glu. Известно много примеров анализа структуры пептидов, когда удавалось проводить идентификацию остатков Asp (Glu), расположенных внутри молекулы пептида и имевших свободные карбоксильные группы боковых цепей. Например, ТФ-методом определена аминокислотная последовательность большого числа таких коротких пептидов после их присоединения к аминополистиролу при pH 5,0 при помощи водорастворимого карбодиимида [67]. Эта методика основана на работе [109] с некоторыми доработками. Таким образом, проблему присоединения по боковым цепям в целом можно решать термодинамически и(или) статистически, тщательно регулируя выход на стадии конденсации пептида.

Описан усовершенствованный вариант присоединения белков к пористым стеклянным шарикам, активированным ДИТЦ [22].

В этой же работе предложена иммобилизация больших пептидов по остаткам His и Tyr на диазотированных ариламиноносителях или по остаткам Cys — на иодоацетамидированных стеклянных шариках. Разработаны способы присоединения пептидов или промежуточных соединений, несущих аминогруппу, к носителю посредством сложноэфирной связи [14].

Иногда карбодиимиды используют в комбинации с активирующими добавками, способствующими образованию сложноэфирной связи (например, N-гидроксисукцинимид или 1-гидроксибензотриазол) [1, 28, 64]. Быстрое образование активных сложных эфиров препятствует появлению неактивных N-ацилмочевин. Для обеспечения необходимой скорости реакции карбодиимиды и активирующие добавки должны присутствовать в большом избытке, но при этом они могут реагировать друг с другом, давая нежелательные побочные продукты, что наблюдалось в случае совместного использования дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) [38, 69] и N-гидроксисукцинимида [55].

В последнее время в пептидном синтезе стали использовать новый активатор — N-гидрокси-5-нонборнен-2,3,-дикарбоксиимид, который оказался очень устойчивым в присутствии ди-

циклогексилкарбодиимида (ДЦК) [37]. Этот активатор может быть с успехом использован в ТФ-присоединениях; в дополнение ко всему сказанному он растворим как в воде, так и в органических растворителях.

Недавно предложен простой и удобный метод активации карбоксильной группы пептида перед его иммобилизацией. При растворении и выдерживании пептида в смеси ТФУ и ангидрида ТФУ, по-видимому, образуется смешанный ангидрид. Затем удаляют легколетучие соединения. Активированный пептид растворяют в ДМФА, добавляют аминокислоту. Предварительное растворение образца в ТФУ облегчает последующее растворение в ДМФА [70]. Выходы стадии присоединения малых и средних по размерам пептидов колеблются от 55% до 98%; высокие выходы свидетельствуют о том, что трифтороацетильная группа является легко уходящей [66]. При обработке пептидов, содержащих Gln, может произойти частичное дезамидирование последнего, а в случае пептидов, содержащих Asp, возможно образование циклических имидов. Вышеуказанные проблемы можно сделать менее острыми, если найти способ активации только части карбоксильных групп. Возможно, затем удастся провести селективную активацию С-концевых остатков с образованием промежуточных оксазолинонов.

Для усовершенствования ДИТЦ-метода присоединения лизилсодержащих триптических пептидов предложен гетеробифункциональный реагент, лактон *п*-изотиоцианатобензоил-D,L-гомосерина [40, 101]. Сначала аминогруппы пептида реагируют с группами N=C=S реагента. Обработка полученного соединения ТФУ ведет к образованию лактона и укороченного на одну аминокислоту пептида со свободной N-концевой аминогруппой. Затем пептид конденсируют с носителем, содержащим аминогруппу; при этом лактон, оставшийся присоединенным к боковой цепи остатка Lys, реагирует с аминогруппами носителя. Активация пептида в виде соединения, имеющего лактонный фрагмент, оказалась высокоэффективным средством увеличения выхода на стадии присоединения пептида [45]. Не требуется большого избытка реагента, обычно применяемого для предотвращения поперечного сшивания пептида, так как две группы реагента сильно различаются по реакционной способности.

Пептиды можно присоединить к носителю в два приема — сначала высокоэффективным, хорошо отработанным методом «пришить» его к носителю временной связью, потом жестко присоединить требуемой связью за счет внутримолекулярной реакции. Например, пептиды, не содержащие Lys, присоединяли к носителю сначала за α-аминогруппу при помощи ДИТЦ, затем за карбоксильную группу посредством обычно менее эф-

фективной карбодиимидной конденсации [90]. Предварительное временное присоединение сильно повысило эффективную концентрацию пептида на поверхности носителя, что увеличило выход второго присоединения. Последующая обработка ТФУ вызывает отщепление N-концевой аминокислоты; полученный укороченный пептид готов к определению последовательности. Истинно внутримолекулярный механизм присоединения был использован в работе [105], где применялся предложенный ранее метод четырехкомпонентной конденсации [104]. Оба упомянутых подхода по глубине замысла являются наиболее развитыми и обладают многообещающим потенциалом.

Во внутримолекулярном «содействии» реакции присоединения могут участвовать и нуклеофильные группы носителя. Этим может объясняться повышенная реакционная способность 1,2-диаминов по сравнению с моноаминами [45]. Например, матрицы, несущие этилендиамин или триэтилентетрамин (ТЕТА), являются по отношению к лактону гомосерина более реакционноспособными, чем ω-алкиламины. Поэтому при выборе метода конденсации пептида следует учитывать характер нуклеофильных групп носителей, подбирая их таким образом, чтобы при использовании данного метода активации карбоксильных групп присоединение прошло эффективно.

Избыток неиспользованных аминогрупп носителя может вызвать осложнения. Если после присоединения пептида эти группы остаются немодифицированными, то они будут карбамоилированы на первой же стадии реакции Эдмана. По нашим данным, это приводит к ухудшению результатов отщепления и высокому уровню фона [64]. При использовании МИТЦ вместо ФИТЦ на первом цикле отщепления значительно увеличивается выход отщепленных аминокислот и снижается уровень фона. Для успешного определения последовательности на микроуровне очень важно найти еще более эффективный реагент для «забивки» остаточных аминогрупп носителя. При этом реагент не должен необратимо блокировать аминогруппу N-концевой аминокислоты или изменять строение боковых цепей аминокислот. Если N-концевая аминогруппа пептида предварительно защищена БОК или другой легкоудаляемой группой, то эффективным методом «забивки» может быть ацетилирование избытка реакционноспособных аминогрупп носителя мягкими реагентами — сложными эфирами уксусной кислоты. После присоединения БОК пептидов к макропористым полистирольным смолам мы обрабатываем носитель метилацетимидатом (*G. C. DuBois*, *V. Alvarez*, *E. Apella*, неопубликованные данные). Положительно заряженные амидиновые группы, появляющиеся на смоле после «забивки», возможно, увеличивают гидрофильность и сольватацию носителя. В целом операция «забивки» позволяет

улучшить структуру поверхности носителя.

Однако планируя и проводя такую обработку поверхности, надо предусматривать и исключать возможность последующих побочных реакций между функциональными группами модифицирующего агента и присоединенным пептидом, которые приводят к падению выходов при определении последовательности и возрастанию уровня фона.

16.2.4. Отщепление по Эдману

Предварительное расщепление пептидов, присоединенных к ТФ-носителям, проводится почти исключительно по методу Эдмана с применением реагентов и условий, аналогичных таковым для ЖФ-анализа. Обсуждение этих методик читатель может найти в литературе, относящейся к разд. 16.2.1.

Главное преимущество химии ТФ-анализа заключается в гибкости выбора буферов, растворителей, режимов промывок, реагентов, различных добавок, температуры. Потери образца с экстракциями, а также летучесть или растворимость вещества в ходе анализа налагают очень незначительные ограничения на рабочие параметры, за исключением тех случаев, когда пептиды присоединены адсорбционными связями или когда реакции проводят в газотвердофазной системе.

При работе и ЖФ- и ТФ-методами следует предъявлять одинаково высокие требования к чистоте используемых реактивов и растворителей. Нельзя полностью исключить присутствие вредных примесей и протекания побочных реакций, но их влияние значительно снижается при использовании минимальных объемов и концентраций реагентов. ТФ-реакции можно проводить в постоянном потоке свежих реагентов с удалением побочных продуктов; это преимущество легко реализовать в миниатюризованных системах, где перенос тепла (при предварительном подогреве реагентов) не представляет проблемы.

16.2.4.1. Реакции присоединения реагента. В этой реакции образования фенилтиокарбамоилпептидов (ФТК-пептидов) или их аналогов буферы не играют никакой роли в образовании пленки и удержании пептида; в ходе реакции высвобождается или потребляется очень мало водородных ионов, и поэтому ее можно проводить, используя очень низкие концентрации буфера. Представляется заманчивым увеличить эффективность взаимодействия реагента с полипептидом путем использования различных добавок (денатурирующие вещества, катализаторы реакции, поглотители примесей), однако при введении этих новшеств следует взвешивать возможность появления побоч-

ных процессов. Поглотители (например, первичные амины), используемые в молярных концентрациях, превышающих концентрации пептидов (но не изотиоцианата), могут быть полезны в анализе и на микроуровне, так как с их помощью можно удалить альдегиды и другие высокоактивные примеси. Верхний предел концентрации аминов определяется еще и тем, что их присутствие не должно вызывать побочных реакций, подобных тем, что происходят после «забивки» ФТК-группами поверхности носителя.

Правильный выбор реагента для реакции — принципиальное условие успеха. Выбор водных сред вместо неводных частично вызван необходимостью сольватации присоединенных пептидов, имеющих разный состав. Вода облегчает сольватацию, но она же вызывает гидролиз изотиоцианата, приводящий к последующим побочным реакциям. При решении этого вопроса следует непредубежденно относиться к новым предложениям.

16.2.4.2. Реакции отщепления. ТФУ оказалась наилучшим из отщепляющих агентов, найденных до сих пор. Ее легче очищать, чем более высокомолекулярные перфторокислоты, а ее летучесть оказывается преимуществом при получении и превращениях отщепленных продуктов (анилинотиазолинонов, АТЗ).

В принципе можно использовать и другие сильные кислоты, например BF_3. Решающим доводом «за» или «против» использования того или иного метода отщепления может служить выход Ser в виде ФТГ или другого производного, пригодного для идентификации.

В ТФ-методе тиазолинон аминокислоты (АТЗ) обычно смывают с колонки той же кислотой, которой проводят отщепление АТЗ. Поскольку ТФУ — сильный элюирующий растворитель, то на этой стадии цикла она смывает со смолы многие адсорбированные вещества, которые оказываются в растворе вместе с АТЗ и загрязняют его.

При малых размерах реакционной колонки собранные АТЗ нетрудно охладить сразу после их образования и тем самым предохранить от разрушения. Отщепление обычно проводят при повышенных температурах в течение времени, достаточного для получения наиболее трудно отщепляемых остатков (например, Pro [15, 41]). В другом варианте можно проводить циклизацию и отщепление парами кислоты, действующими на сухой связанный пептид [42, 56]. После вытеснения паров кислоты инертным газом АТЗ можно смыть растворителем с меньшей элюирующей способностью, чем ТФУ, и поэтому в растворе будет меньше загрязняющих примесей.

Отщепление АТЗ кислотой следует заканчивать до начала их элюирования с колонки (или проводить отщепление в несколь-

ко приемов с промежуточными высушиваниями колонки). При этом высокореакционноспособные АТЗ концентрируются на поверхности носителя при повышенной температуре. Так как при выдерживании в этих условиях они склонны к разрушению, то при выборе режима отщепления АТЗ следует опираться на тщательный контроль условий эксперимента.

Необходимо контролировать содержание воды в ТФУ. Если кислота содержит слишком мало воды, то она находится в равновесии с небольшим количеством трифтороуксусного ангидрида. Последний может реагировать с ФТК-пептидом, давая нерастворимый побочный продукт [8]. Ангидрид может удерживаться адсорбционными силами на поверхности носителя при помощи потенциально реакционноспособных трифтороацетильных производных различных структурных элементов носителя (например, OH- и NH-групп [91]). Эти производные при добавлении буфера (на стадии присоединения реагента в следующем цикле) блокируют N-концевую аминокислоту пептида.

В то же время слишком высокое содержание воды в ТФУ приводит к недопустимо высокому уровню расщепления внутренних пептидных связей и снижает скорость отщепления АТЗ. До сих пор неясно, какое содержание воды следует считать разумным компромиссом. Необходима разработка удобных и надежных методов определения содержания воды в ТФУ.

16.2.4.3. Реакции превращения. Аминокислоты, отщепленные ТФ-методом в виде АТЗ, обычно превращают в ФТГ-производные аминокислот теми же способами, что и в ЖФ-анализе. Некоторые из последних результатов в обнаружении и количественном определении ФТГ-производных аминокислот приведены в разд. 16.3.3. Недавно была предложена новая реакция превращения, использованная и в ТФ, и в ручном варианте определения — быстрый аминолиз тиазолинонов (в сухом состоянии или в растворе) первичными алкиламинами, дающими алкиламиды ФТК-аминокислот [1, 50, 51, 57]. Эти реакции не требуют нагревания или экстракции. По окончании реакции избыток амина удаляется в потоке азота. По своему хроматографическому поведению и поглощению в УФ-области спектра алкиламиды подобны ФТГ-аминокислотам. Детали методики изложены в работе [51]. Несколько интересных реакций конверсии кратко описаны в сообщении [81]. 5-Метилтиазолиноны (МТА) можно О-ацетилировать уксусным ангидридом и затем идентифицировать полученные производные методом ГЖХ. МТА можно расщепить водным аммиаком и получить амиды исходных аминокислот.

16.2.4.4. Идентификация и количественный анализ. Чувствительность процесса определения последовательности можно уве-

личить, используя на стадии присоединения модифицированные реагенты. В данной главе не рассматриваются методы, связанные с использованием радиоактивных меток или интенсивно окрашенных изотиоцианатов, так как они с самого начала развивались в рамках методологии ручного или автоматизированного ЖФ-определения последовательности.

Описано использование [^{35}S]ФИТЦ в автоматическом ТФ-анализе [17, 18]. Хотя в лучших экспериментах провозглашалась возможность обнаружения пикомольных количеств ФТГ-аминокислот, в повседневной практике определение проводили на уровне $\geqslant$100 пмоль (*Waxdall*, частное сообщение). Главными проблемами являются, во-первых, относительно низкий уровень удельной радиоактивности доступного реагента, во-вторых, разбавление реагента в больших полостях реактора и системы подачи реагента в реактор.

Предложена усовершенствованная схема подачи [^{35}S]ФИТЦ, [44]. Для резкого уменьшения объема колонки необходимо существенное улучшение свойств ТФ-носителей. Указанные нововведения должны также снизить уровень радиоактивного фона, который становится серьезной проблемой при работе с пикомольными количествами пептида. Мы полагаем, что в будущем возможности анализа чрезвычайно малых количеств вещества с применением радиоактивных изотиоцианатов окажутся гораздо более благоприятными для ТФ-метода, чем для ЖФ-определений. Чувствительность ТФ-анализа можно существенно увеличить и без применения дорогостоящих и опасных радиоактивно меченных реагентов. Описан ручной ТФ-метод с применением N,N-диметиламиноазобензол-4′-изотиоцианата (ДАБИТЦ) [21] (гл. 14). Этот реагент дает интенсивно окрашенные тиогидантоиновые производные (ДАБТГ). Недавно эти производные были разделены, идентифицированы количественно при помощи ВЭЖХ на уровне 5—10 пмоль [24, 107]; ДАБТГ-производные аминокислот поглощают при длине волны 436 нм. Сообщалось об использовании этого метода в автоматическом ТФ-анализе [46]. В каждом цикле после реакции взаимодействия ДАБИТЦ с полипептидом для полной «забивки» N-концевых аминогрупп проводят дополнительную реакцию с более эффективно реагирующими ФИТЦ. Получающиеся ФТГ-аминокислоты бесцветны и не мешают идентификации окрашенных тиогидантоинов [23]. По нашему мнению, проведение реакции в колонке (ручным методом или автоматическим) дает значительные преимущества по сравнению с исходным вариантом метода (реакция в пробирке) [21]. Мы успешно проводили ручное ТФ-определение последовательности (при помощи ФИТЦ) на малых количествах пептидил-носителя, помещенного поверх крошечного кусочка стеклянной ваты в сужен-

ной части пастеровской пипетки. Последнюю укоротили с обоих концов; получившуюся маленькую колонку обогревали внутри пробирки, помещенной в баню с пропиленгликолем; промывку колонки легче проводить, приложив небольшое избыточное давление азота.

16.2.5. Другие методы последовательного отщепления

Твердофазный метод позволяет использовать для анализа аминокислотной последовательности подходы, отличающиеся от реакции Эдмана. Многие реагенты, пригодные для проведения альтернативных химических реакций, нельзя применять в ЖФ-методе из-за того, что простой экстракцией часто невозможно полностью удалить избыток реагентов и продукты побочных реакций.

Ниже изложены основы нескольких альтернативных подходов, рассматриваются их возможности и ограничения.

16.2.5.1. Определение N-концевой последовательности при помощи тиоацилирования и кислотного отщепления. Несколько методов последовательного отщепления основаны на присоединении тиоацильной группы R=C=S к N-концевой аминогруппе пептида с последующей циклизацией N-концевого остатка в кислых условиях и отщеплением его в виде тиазолинона [4, 75, 84]. Этот подход отличается от метода Эдмана и реагентом, используемым на стадии конденсации, и механизмом реакции. Кроме того, на стадии отщепления производного аминокислоты вместо 2-анилинотиазолинона образуется 2-алкил- или 2-арилтиазолинон. Образование этих производных имеет несколько дополнительных преимуществ. Более слабый электроноеттягивающий характер алкильной или арильной групп делает тиокарбонильный атом серы более нуклеофильным. Поэтому циклизация (и отщепление) происходит в менее жестких условиях. Отщепление при помощи ТФУ завершается при комнатной температуре в течение 20 мин [4, 84]. При повышении температуры реакции можно использовать более слабые кислоты или разбавленную ТФУ. Таким образом, возможно, удастся снизить остроту многих проблем, возникающих на стадии кислотного отщепления в реакции Эдмана: расщепление пептидной цепи, дегидратация Ser, Thr, образование сукцинимида из остатка Asn, окисление Trp, циклизации N-концевого Gln в пироглутаминовую кислоту. Следует отметить, что указанные тиазолиноны более устойчивы, чем соответствующие промежуточные продукты реакций Эдмана, и они не могут изомеризоваться в тиогидантоины. Это важное обстоятельство должно способствовать значительному увеличению выходов в альтер-

Таблица 16.1. Тиоацилирующие реагенты (общая формула RC(:S)—X), используемые для последовательного расщепления пептидов

№ реагента	Заместитель R	Уходящая группа X	Литература
1	Фенил	$—SCH_2COO^-$	4
2	Фенил	$—SCH_2CN$	84
3	Фенил	$—CH_2OCH_3$	84
4	Фенил	4-Нитрофенолят	49
5	Фенил	Сукцинимидил	19
6	*п*-Нитрофенил	$—OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$	7
7	Метил	$—SCH_2COO^-$	74, 29
8	Метил	$—SCH_2CH_3$	29
9	Метил	$—SCH_3$	80, 81, 83
10	Этил	$—SCH_3$	86
11	Пропил	$—SCH_3$	86
12	Изопропил	$—SCH_3$	86

нативных реакциях превращения, дающих продукты, подлежащие идентификации.

Для успешного применения этого подхода к анализу последовательности аминокислот необходимо найти такие тиоацилирующие агенты и условия проведения процесса, которые по своей эффективности на стадии конденсации с пептидом не уступали бы ФИТЦ. Использовались реагенты общего вида RC(:S)—X, где R — алкильный или арильный (ароматический компонент), X — активирующая уходящая группа, например —SR′, —QR′, —N<R′. Тиоацилхлориды (X=Cl) обладают высокой реакционной способностью, но они слишком неустойчивы. Тиоацилирующая способность увеличивается по мере увеличения электроноттягивающей силы ацильного заместителя R. Но эта тенденция сопровождается снижением скорости реакции циклизации, так что при выборе подходящего реагента для конденсации с пептидом должен соблюдаться компромисс, помогающий эффективно проводить обе стадии цикла. Опробовано большое число соединений; наиболее перспективные реагенты для последовательного отщепления аминокислот указаны в табл. 16.1. Наличие зарядов на уходящих группах (соединения 1, 6 и 7) чрезвычайно облегчает растворимость реагентов в водноорганических средах, хотя в анализе можно без осложнений использовать системы из безводных растворителей и незаряженных реагентов.

Реакционная способность простых алкилкарбодитионатов (соединения 8—12) очень мала, что делает их практически непригодными для использования, за исключением реакций, проводимых в присутствии катализаторов общего основного типа

(например, ацетата триэтиламмония) в сильнополярных растворителях [83]. Катализ в реакции тиоацилирования может быть внутримолекулярным, как в случае аминолиза холинового эфира *м*-нитробензойной кислоты [7] (табл. 16.1, соединение 6). Этот реагент необыкновенно устойчив к гидролизу. Цианометиловые дитиоэфиры (например, соединение 2) достаточно реакционноспособны [84], но уходящая отщепляемая группа полимеризуется, что приводит к образованию осадков, от которых трудно избавиться. Недавно был описан легко синтезируемый реагент (соединение 5) [19].

Известен вариант автоматического ТФ-анализа, основанный на реакции тиоацилирования [29, 70, 75]. В ходе определения структуры В-цепи инсулина при помощи тиоацетилтиогликолевой кислоты (соединение 7) были успешно идентифицированы 26 аминокислотных остатков; для нескольких белков удалось определить последовательность протяженностью до 40 аминокислот. Постадийные выходы составляли >95%. Идентификацию отщепленных остатков проводили после превращения АТЗ в тиоациламинокислоты или после обратного гидролиза в исходные аминокислоты. Известен вариант быстрой конверсии 2-фенилтиазолинона в метиламид тиобензоиламинокислоты избытком метиламина. Это «мягкое» превращение в будущем может играть важную роль в отщеплениях, проводимых с участием тиоацилирующих реагентов. 2-Фенилтиазолиноны идентифицированы масс-спектрометрически [5]. Эти соединения также превращали в анилиды тиобензоиламинокислот и идентифицировали методом ТСХ [6], однако такой вариант аминолиза проходит медленнее, чем аналогичная реакция с метиламином.

16.2.5.2. С-концевое отщепление. Предложен ряд методов последовательного химического расщепления по карбоксильному концу молекулы пептида (гл. 18). Первые попытки в этом направлении были предприняты еще до описания реакции Эдмана, но они не смогли составить конкуренцию последней. В перспективном, тщательно изученном методе [98] С-концевой карбоксил пептида реагирует с тиоцианатом аммония в уксусном ангидриде: полученный при этом циклический пептидилтиогидантоин обрабатывается кислотой (или ацетогидроксаматом); продуктами последней реакции являются тиогидантоин С-концевого остатка и пептид, укороченный на одну С-концевую аминокислоту. В исходной методике каждый цикл отщепления включал длительные и трудоемкие стадии разделения и сушки. Удавалось отщепить только 2—6 остатков. Однако в связи с развитием ТФ-метода с этим подходом связаны новые надеж-

ды [26, 27, 58]. В цитированных работах сделан общий обзор методов С-концевого анализа.

ТФ-подход значительно стимулировал развитие работ по тиоцианатному расщеплению, хотя до сих пор не удавалось отщепить более 6 аминокислот. Особые сложности возникают при анализе как самих остатков Asn, Asp, Glu, Pro, так и остатков, следующих за ними. Pro отщепляется на первой же операции «своего» цикла отщепления (обработка тиоцианатом аммония), поэтому вместе с ним в продуктах того же цикла появляется следующая аминокислота [58]. Отщепление других вышеприведенных аминокислот происходит с низкими выходами. Идентификацию тиогидантоинов проводили различными методами без использования преимуществ высокочувствительной фотометрии. Трудно оценить возможность определения длинных участков последовательности без проведения дополнительной вдумчивой и систематической работы. Мы надеемся, что подобное исследование будет продолжено, так как С-концевые отщепления могут очень полезно дополнять анализ N-концевой последовательности. Кроме того, количественное присоединение пептидов по α-аминогруппе к нерастворимому носителю происходит в целом значительно легче, чем конденсация по С-концевому карбоксилу.

Предлагались иные подходы к определению С-концевой последовательности в комбинации с ТФ-методом. Пептид присоединяли с помощью карбодиимида к S-алкилтиурониевой соли, затем отщепляли С-концевой остаток в виде иминогидантоина водным раствором основания при pH 10—11,5. Таким путем определяли до пяти С-концевых аминокислот коротких пептидов. Преимущество этого метода перед тиоцианатным заключается в том, что он проводится в более мягких условиях, а недостатком является невозможность отщепления С-концевого Pro; при наличии в этом же положении Asp или Glu последние склонны к образованию циклических ангидридов при конденсации с участием карбодиимида [99].

Недавно сообщалось о новых возможностях проведения С-концевого анализа на нерастворимых носителях. Показано, что сложноэфирную связь можно циклизовать в С-концевой алкоксазол при помощи сильных дегидратирующих агентов [83]. Последующая обработка спиртом в кислой среде дает сложный эфир аминокислоты. Существует другая, отличная от этого подхода схема анализа последовательности с использованием нескольких новых синтетических реагентов [68]. Оба этих подхода, существующие пока только в виде лабораторных разработок; они интересны для творчески мыслящего химика тем, что открывают новые пути к большой цели.

16.3. Автоматический жидкофазный анализ. Усовершенствованные методики

16.3.1. Анализ белков и больших пептидов на обычном уровне

Два главных препятствия до сих пор ограничивают пределы возможностей автоматического ЖФ-метода Эдмана [32]. Первой проблемой является перенос остаточных аминокислот на каждый последующий цикл. Это явление происходит как из-за неполного присоединения реагента к белку, так и из-за неполного отщепления модифицированной N-концевой аминокислоты в виде 2-анилинотиазолинона; другая проблема заключается в том, что на стадии кислотной обработки карбамоилпептида (белка) происходит расщепление внутренних неустойчивых пептидных связей, приводящее к появлению новых полипептидных цепей, т. е. новых последовательностей. В результате этих двух процессов накопление фона ФТГ-аминокислот достигает такого уровня, что однозначная идентификация последовательности аминокислот основной цепи становится невозможной. Для снижения уровня остаточных пиков было предложено проводить и конденсацию, и отщепление АТЗ дважды в каждом цикле [31]. Однако такое изменение стандартной методики приводит к большим потерям пептида (вымывание из реактора). Для снижения этих потерь в реактор добавляют носители — белки или органические полимеры [78, 92], но, к сожалению, белки подвержены ацидолизу, в результате чего возникают ложные последовательности. Для снижения уровня остаточных аминокислот, появляющихся в результате неполного взаимодействия ФИТЦ с полипептидами (особенно если Pro—N-концевой остаток), повышают температуру реактора до 55 °C [94].

Предполагалось, что изменение порядка добавления ФИТЦ и буфера в реактор снизит степень расщепления внутренних пептидных связей [102], так как расщепление связей происходит предположительно в основном из-за N→O-ацильной миграции, в ходе которой гидроксильные группы Ser атакуют пептидные связи, образуемые аминогруппами Ser. Миграция обратима в щелочных условиях, поэтому в отсутствие ФИТЦ конкурирующее тиокарбамоилирование исключается. Это изменение методики не дало ожидаемого эффекта, так как ФИТЦ и гептан не смешиваются с квадрольным буфером. Другой способ снижения уровня расщепления внутренних пептидных связей заключается в регулировании содержания воды в гептафтормасляной кислоте, используемой для отщепления. Высокое содержание воды способствует гидролизу пептидных свя-

зей; в то же время при низком содержании воды в кислоте (~0,01%) уровень расщепления снижается [11]. Сочетание этого подхода с использованием различных буферов на стадии карбамоилирования (например, N,N,N′,N′-тетракис(2-гидроксиэтил)этилендиамин вместо квадрола) позволяет проводить автоматический анализ с постадийным выходом, превышающим 98% [10].

Значительное увеличение возможностей прибора (анализ последовательности 60—70 аминокислот) было достигнуто за счет модификации стандартного прибора (большой объем реактора, увеличение скорости вращения реактора до 1800—3600 об/мин, охлаждаемая ловушка, соединенная с высоковакуумным насосом) [34].

16.3.2. Анализ последовательности аминокислот небольших и гидрофобных пептидов

Общеизвестно, что автоматический анализ таких объектов часто оканчивается неудачно из-за вымывания пептида при экстракции реакционной массы растворителями и остаточными количествами реагентов. Поскольку наибольшие потери происходят при промывании реактора этилацетатом, удаляющем квадрол, было предложено заменить квадрол летучим буфером, удаляемым испарением в вакууме, и тем самым исключить из программы этилацетатную промывку [77]. Для анализа полной аминокислотной последовательности неполярных пептидов требуются дополнительные изменения как в методике, так и в программе отщепления.

Пептиды, содержащие С-концевые остатки Lys или S-аминоэтилцистеина, модифицировали 4-сульфофенилизотиоцианатом для увеличения гидрофильности пептида [16, 52].

Этот реагент присоединяется как к N-концевой α-аминогруппе, так и к аминогруппам боковых цепей упомянутых аминокислот. При обработке кислотой отщепляется первый остаток, а второй готов к участию в обычной реакции Эдмана; сульфофенилтиокарбамоильная группа, присоединившаяся к боковой цепи С-концевой аминокислоты, остается неотщепленной. Единственный недостаток этой методики заключается в неполном отщеплении первого остатка, что сильно снижает начальный выход и вносит высокий фон остаточных аминокислот в самом начале анализа. Кроме того, идентификация первой аминокислоты представляет некоторую трудность. Сообщалось, что изомер (3-сульфофенилизотиоцианат) обладает некоторыми преимуществами при проведении этой модификации [30], однако до сих пор мало известно о его использовании. Для увеличения гидрофильности пептида можно амидировать карбоксильные

группы боковых цепей 2-амино-1,5-дисульфонатом [36]. Однако необходимая для этого активация карбоксилов может привести к блокированию N-концевой аминогруппы и вызвать внутреннюю циклизацию остатков Asp.

Для снижения потерь пептида с экстракциями предложен и другой подход. После проведения стадии карбамоилирования квадрол не экстрагируют растворителями, а оставляют в реакторе для получения гидрофильной пленки, удерживающей пептид [25]. Однако сохранение квадрола в реакторе невыгодно, ибо в результате добавления его в каждом цикле после проведения нескольких циклов в реакторе накапливается большое количество солей.

Предполагалось, что «якорем», удерживающим пептид в реакторе, может служить белок с блокированной N-концевой аминокислотой, не вступающий в реакцию Эдмана. С этой целью использовался парвальбумин [89].

Но этот белок при воздействии кислоты подвергается хаотическому расщеплению; появляются новые последовательности, возрастает уровень фона ФТГ-аминокислот. Удерживание малых или гидрофобных пептидов в реакторе значительно возрастает в присутствии полибрена — синтетического полимера, имеющего положительно заряженные четвертичные атомы азота и инертного в условиях анализа последовательности [59, 100]. Мы использовали его при работе с очень большими пептидами, содержащими много неполярных аминокислот. Для некоторых пептидов получены хорошие результаты; в то же время мы не заметили существенного влияния добавления полибрена при работе с другими большими фрагментами или целыми белками. Более того, при использовании полибрена мы наблюдали снижение начальных выходов (см. также гл. 15).

16.3.3. Анализ на микроуровне

Во многих случаях требуется проводить анализ малых количеств труднодоступного белка. Для снижения расхода анализируемого материала до 1—10 нмоль потребовалось значительное усовершенствование существующих методов. Например, модификация ЖФ-секвенатора включала создание системы стабильного высокого вакуума, разработку новых методик экстракции, использование специально сконструированных герметичных клапанов подачи реагентов с нулевыми мертвыми объемами, введение в схему прибора автоматического конвертора [108—110]. Эти усовершенствования были подхвачены и объединены с системой высокоэффективной очистки реагентов, растворителей и с использованием полибрена [47]. В последней работе, израсходовав всего 200 пмоль образца, удалось

определить последовательность 47 остатков миоглобина кашалота; постадийные выходы составляли 95,5%. Для улучшения рабочих параметров ЖФ-секвенатора был сконструирован прибор новой конструкции [48] (см. также гл. 17). На этом приборе удалось определить протяженные последовательности, анализируя 20 пмоль белка или 200 пмоль пептидов. Попытки дальнейшего увеличения чувствительности с использованием всех вышеупомянутых методик большого успеха не имели, так как по-прежнему не решены проблемы вымывания образца в каждом цикле отщепления и загрязнения ФТГ-аминокислот примесями, образующимися в ходе процесса.

Использование высокочувствительных методик с применением радиоактивности помогло преодолеть часть этих проблем. Радиоактивная метка вводится либо в аминокислоты (биосинтетически), либо в реагенты, используемые для анализа последовательности. Белки, меченные биосинтетически in vivo или in vitro, должны быть очищены с помощью микрометодов; во многих случаях продукт, пригодный для анализа, можно получить при помощи иммунохимической очистки. В различных лабораториях анализировали радиоактивно меченные белки, расходуя 0,1—1,0 пмоль материала [79, 103]. Единственным крупным недостатком этого метода является то, что не все белки можно метить in vivo или в культуре ткани из-за низкого их содержания и(или) малой скорости синтеза.

Примером использования радиоактивно меченных реагентов служит работа [54]. В каждом цикле отщепления белок обрабатывают сначала [^{35}S]ФИТЦ, затем «холодным» ФИТЦ. Этим методом удалось установить последовательность ~20 аминокислот, израсходовав 5—15 пмоль белка. В разд. 16.2.4.4 рассмотрено применение этого подхода в ТФ-анализе последовательности [17, 18]. Недостатком метода, как в случае ЖФ, так и в случае обычного ТФ-секвенатора, является большой расход реагента, необходимый для того, чтобы покрыть большую площадь поверхности реактора секвенатора. Это в свою очередь ведет к высокому уровню радиоактивного фона в анализе очень малых количеств образца и делает сам анализ и дорогим, и опасным.

В последнее время постоянно увеличивается применение ВЭЖХ в анализе последовательности аминокислот на микроуровне (гл. 6). Это позволяет выделить микрограммовые количества пептидов в виде растворов, пригодных для прямого нанесения в реактор секвенатора [112]. Важным дополнительным методом анализа коротких пептидов является масс-спектрометрия [12, 60, 73]; чрезвычайно высокая чувствительность этого метода может способствовать его широкому предпочтительному распространению.

16.4. Заключение

Мы уверены в том, что потребность в быстром, удобном и высокочувствительном анализе последовательности белков и пептидов в ближайшие годы значительно возрастает. Понимание природы и механизма управления клеточной дифференцировкой потребует однозначной идентификации и описания свойств многих рецепторов и эффекторов клеточной мембраны и многочисленных пептидов, включенных в передачу сигналов между клетками (гормоны, рилизинг-факторы и т. д.). Изучение структуры и организации генов проводится различными методами, дающими последовательности ДНК, которые можно перевести в белковые последовательности. Перевод последовательности мРНК в аминокислотную последовательность белка будет отчасти зависеть от независимо проведенного определения структуры пептидов.

Одного лишь определения последовательности нуклеотидов ДНК никогда не будет достаточно для установления точек посттрансляционной модификации белка.

При сравнении реально используемых методов анализа последовательности с сегодняшними и будущими требованиями становится ясно, что требуются новые «прорывы» в методологии. В создании автоматизированного оборудования для анализа структуры и сопутствующих методов достигнуты громадные успехи. Но совершенство оборудования оказалось фактором, ограничивающим развитие будущей методологии. Это ограничение можно преодолеть только энергичным проведением новых исследований химических аспектов анализа структуры. Мы полагаем, что наибольший выигрыш в развитии высокочувствительных методов установления аминокислотной последовательности может быть получен при использовании новых химических идей именно в ТФ-анализе, где первоочередное внимание следует уделять кинетике реакций, носителям, миниатюризации приборов. В некоторых случаях химический и ферментативный подходы в сочетании с масс-спектрометрическим анализом могут играть важную роль в новой методологии. Мы надеемся, что многие исследователи осознают важность этой задачи.

Литература

1. *Apella E., Inman J. K., DuBois G. C., See Previero A., Coletti-Previero M.-A.* (Eds.), pp. 121—133 (1977).
2. *Arshady R., Atherton E., Gait M. J., Lee K., Sheppard R. C.*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1979, 423—425 (1979).
3. *Atherton E., Gait M. J., Sheppard R. C., Williams B. J.*, Bioorganic Chemistry, 8, 351—370 (1979).
4. *Barrett G. C.*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 487—488 (1967).

5. *Barrett G. C., Chapman J. R.*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 335—336 (1968).
6. *Barrett G. C., Khokhar A. R.*, J. Chromatogr., **39**, 47—52 (1969).
7. *Barrett G. C., Leigh P. H.*, FEBS Lett., **57**, 19—21 (1975).
8. *Barrett G. C., Hume J., Usmani A. A.*, See [82], pp. 57—68.
9. *Bayer E., Mutter M., Polster J., Uhmann R.*, In: Peptides 1974, Proc. Thirteenth European Peptide Symposium, Wolman Y. (Ed.), Wiley, New York, pp. 129—136 (1975).
10. *Begg G. S., Morgan F. J.*, FEBS Lett., **66**, 243—245 (1976).
11. *Begg G. S., Pepper D. S., Chesterman C. N., Morgan F. J.*, Biochemistry, **17**, 1739—1744 (1978).
12. *Biemann K.*, In Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins, Liu T.-Y., Schechter A. N., Heinrikson R. L., Condliffe P. G. (Eds.), Elsevier/North-Holland, New York, pp. 131—148 (1981).
13. *Birr C.* (Ed.), Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, Proc, Third Internat. Conf., Elsevier/North Holland, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 1—531 (1980).
14. *Berr C., Garoff H.*, See [82], pp. 177—183.
15. *Brandt W. F., Edman P., Henschen A., Von Holt C.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, 1505—1508 (1976).
16. *Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 1589—1590 (1970).
17. *Bridgen J.*, Biochemistry, **15**, 3600—3604 (1976).
18. *Bridgen J., Waxdal M. J.*, See [82], pp. 153—162.
19. *Cavadore J.-C.*, Anal. Biochem., **91**, 236—240 (1978).
20. *Cavadore J.-C., Vallet B.*, Anal. Biochem., **84**, 402—405 (1978).
21. *Chang J. Y., Creaser E. H., Hughes G. J.*, FEBS Lett., **78**, 147—150 (1977).
22. *Chang J. Y., Creaser E. H., Hughes G. J.*, FEBS Lett., **84**, 187—190 (1977).
23. *Chang J. Y., Brauer D., Wittmann-Liebold B.*, FEBS Lett., **93**, 205—214 (1978).
24. *Chang J. Y., Lehmann A., Wittmann-Liebold B.*, Anal. Biochem., **102**, 380—383 (1980).
25. *Crewther W. G., Inglis A. S.*, Anal. Biochem., **68**, 572—585 (1975).
26. *Darbre A.*, Methods Enzymol., **47**, 357—369 (1977).
27. *Darbre A., Rangarajan M., See Laursen R. A.* (Ed.), pp. 131—137 (1975).
28. *DiBello C., Marigo A., Buso O., Lucchiari A.*, Tetrahedron Lett., no. **13**, 1135—1136 (1977).
29. *Doolittle L. R., Mross G. A., Fothergill L. A., Doolittle R. F.*, Anal. Biochem., **78**, 491—505 (1977).
30. *Dwulet F. E., Gurd F. R. N.*, Anal. Biochem., **76**, 530—538 (1976).
31. *Edman P.*, In: Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 232—279 (1975).
32. *Edman P., Begg G.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80—91 (1967).
33. *Elzinga M.* (*Ed.*), Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Fourth Internat. Conf., Hummana Press, Clifton, New Jersey, pp. 1—589 (1982).
34. *Fairwell T., Brewer H. B., Jr.*, Anal. Biochem., **99**, 242—248 (1979).
35. *Fankhauser P., Brenner M.*, In: The Chemistry of Polypeptides, Katsoyannis P. G. (Ed.), Plenum Press, New York, pp. 389—411 (1973).
36. *Foster J. A., Bruenger E., Hu C. L., Albertson K., Franzblau C.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **53**, 70—74 (1973).
37. *Fujino M., Kobayashi S., Obayashi M., Fukuda T., Shinagawa S., Nishimura O.*, Chem. Pharm. Bull., **22**, 1857—1863 (1974).
38. *Gross H., Bilk L.*, Tetrahedron, **24**, 6935—6939 (1968).
39. *Hancock W. S., Prescott D. J., Vagelos P. R., Marshall G. R.*, J. Org. Chem., **38**, 774—781 (1973).

40. *Herbrink P., Tesser G. I., Lamberts J. J. M.*, FEBS Lett., **60**, 313—316 (1975).
41. *Hermodsón M. A., Ericsson L. H., Titani K., Neurath H., Walsh K. A.*, Biochemistry, **11**, 4493—4502 (1972).
42. *Hewick R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W. J.*, J. Biol. Chem., **256**, 7990—7997 (1981).
43. *Horn M. J., See Laursen R. A.* (Ed.), pp. 51—60 (1975).
44. *Horn M. J., Bonner A. G.*, See [82], pp. 163—176.
45. *Horn M. J., Laursen R. A.*, FEBS Lett., **36**, 285—288 (1973).
46. *Hughes G. J., Winterhalter K. H., Lutz H., Wilson K. J.*, FEBS Lett., **108**, 92—97 (1979).
47. *Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Biochemistry, **17**, 2124—2133 (1978).
48. *Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Science, **207**, 523—525 (1980).
49. *Inglis A. S., Maclaren J. A.*, Proc. Australian Biochem. Soc., **4**, 31 Abs, (1971).
50. *Inman J. K., Appella E., See Laursen R. A.* (Ed.), pp. 241—253 (1975).
51. *Inman J. K., Apella E.*, Methods Enzymol., **47**, 374—385 (1977).
52. *Inman J. K., Hannon J. E., Appella E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 2075—2081 (1972).
53. *Inman J. K., DuBois G. C.*, Appella E., See [82], pp. 81—94.
54. *Jacobs J. W., Niall H. D.*, J. Biol. Chem., **250**, 3629—3636 (1975).
55. *Jakubke H.-D., Klessen Ch.* J. f. Prakt. Chem., **319**, 159—162 (1977).
56. *Jentsch J., See Laursen R. A.* (Ed.), pp. 193—202 (1975).
57. *Jörnvall H., Inman J. K., Appella E.*, Anal. Biochem., **90**, 651—661 (1978).
58. *Kassell B., Krishnamurti C., Friedman H. L.*, See [82], pp. 39—48.
59. *Klapper K. G., Wilde C. E., III, Capra J. D.*, Anal. Biochem., **85**, 126—131 (1978).
60. *Krutzsch H. C.*, In: Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins, Liu T.-Y., Schechter A. N., Heinrikson R. L., Condliffe P. G. (Eds.), Elsevier/North-Holland, New York, pp. 149—159 (1981).
61. *Laursen R. A.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 5344—5346 (1966).
62. *Laursen R. A.*, Eur. J. Biochem., **20**, 89—102 (1971).
63. *Laursen R. A.* (Ed.), Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. First Internat. Conf., Pierce, Rockford, Illinois USA, pp. 1—282 (1975).
64. *Laursen R. A.*, Methods Enzymol., **47**, 277—299 (1977).
65. *Laursen R. A.*, See [82], pp. 95—106.
66. *Lee H.-M., Riordan J. F.*, Anal. Biochem., **89**, 136—142 (1978).
67. *L'Italien J. J., Laursen R. A.*, J. Biol. Chem., **256**, 8092—8101 (1981).
68. *Loudon G. M., Parham M. E.*, Tetrahedron Lett., no. **5**, 437—440 (1978).
69. *Low M., Kisfaludy L.*, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **44**, 61—66 (1965).
70. *Machleidt W., Wachter E.*, Methods Enzymol., **47**, 263—277 (1977).
71. *Mech C., Jeschkeit H., Schellenberger A.*, Eur. J. Biochem., **66**, 133—138 (1976).
72. *Merrifield R. B.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 2149—2154 (1963).
73. *Morris H. R.*, Mature (Lond.), **286**, 447—452 (1980).
74. *Mross G. A., Doolittle R. F.*, Fed. Proc., **30**, 1241 Abs. (1971).
75. *Mross G. A., Doolittle R. F.*, In: Advanced Methods in Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1—20 (1977).
76. *Mutter M., Bayer E.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **13**, 88—89 (1974).
77. *Niall H. D., Penhasi H., Gilbert P., Myers R. C., Williams F. G., Potts J. T., Jr.*, Fed. Proc., **28**, 661 Abs (1969).
78. *Niall H. D., Jacobs J. W., Van Rietschoten J., Tregear G. W.*, FEBS Lett., **41**, 62—64 (1974).
79. *Palmiter R. D., Gagnon J., Ericsson L. H., Walsh K. A.*, J. Biol. Chem., **252**, 6386—6393 (1977).

80. *Previero A.*, Methods Enzymol., **47**, 289—299 (1977).
81. *Previero A., Cavadore J.-C.*, See [63], pp. 63—72.
82. *Previero A., Coletti-Previero M.-A.* (Eds.), Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Second Internat. Conf., North-Holland, Amsterdam, pp. 1—296.
83. *Previero A., Coletti-Previero M.-A.*, See [82], pp. 49—56.
84. *Previero A., Pechere J.-F.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **40**, 549—556 (1970).
85. *Previero A., Derancourt J., Coletti-Previero M.-A., Laursen R. A.*, FEBS Lett., **33**, 135—138 (1975).
86. *Previero A., Gourdol A., Derancourt J., Coletti-Previero M.-A.*, FEBS Lett., **51**, 68—72 (1975).
87. *Regen S. L.*, J. Am. Chem. Soc., **99**, 3838—3840 (1977).
88. *Regen S. L., Dulak L.*, J. Am. Chem. Soc., **99**, 623—625 (1977).
89. *Rochat H., Bechis G., Kopeyan C., Gregoire J.*, Van Rietschoten J., FEBS Lett., **64**, 404—408 (1976).
90. *Schiltz E., See Laursen R. A.* (Ed.), pp. 47—50 (1975).
91. *Schuttenberg H., Schulz R. C.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **15**, 777—778 (1976).
92. *Silver J., Hood L. E.*, Anal. Biochem., **60**, 285—292 (1974).
93. *Smith C. W., Stahl G. L., Walter R.*, Int. J. Peptide Protein Res., **13**, 109—112 (1979).
94. *Smithies O., Gibson D., Fanning E. M., Goodfliesh R. M., Gilman J. G., Ballantyne D. L.*, Biochemistry, **10**, 4912—4921 (1971).
95. *Stahl G. L., Walter R., Smith C. W.*, J. Org. Chem., **43**, 2285—2286 (1978).
96. *Stahl G. L., Smith C. W., Walter R.*, J. Org. Chem., **44**, 3424—3425 (1979).
97. *Stahl G. L., Walter R., Smith C. W.*, J. Am. Chem. Soc., **101**, 5383—5394 (1979).
98. *Stark G. R.*, Methods Enzymol., **25**, 369—384 (1972).
99. *Tarr G. E., See Laursen R. A.* (Ed.), pp. 139—147 (1975).
100. *Tarr G. E., Beecher J. F., Bell M., McKean D. J.*, Anal. Biochem., **84**, 622—627 (1978).
101. *Tesser G. I., Lamberts J. J. M.*, Int. J. Peptide Protein Res., **8**, 559—563 (1976).
102. *Thomsen J., Bucher D., Brunfeldt K., Nexo E., Olesen H.*, Eur. J. Biochem., **69**, 87—96 (1976).
103. *Uehara H., Ewenstein B. M., Martinko J. M., Nathenson S. G., Coligan J. E., Kindt T. J.*, Biochemistry, **19**, 306—315 (1980).
104. *Ugi I.*, Angew Chem., **74**, 9—22 (1962).
105. *Wachter E., Werhahn R.*, See [82], pp. 185—192.
106. *Wachter E., Hofner H., Machleidt W., See Laursen R. A.* (Ed.), pp. 31—46 (1975).
107. *Wilson K. J., Rodger K., Hughes G. J.*, FEBS Lett., **108**, 87—91 (1979).
108. *Wittmann-Liebold B.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 1415—1431 (1973).
109. *Wittmann-Liebold B., Lehmann A., See Laursen R. A.* (Ed.), pp. 81—90 (1975).
110. *Wittmann-Liebold B., Geissler A. W., Marzinzig E.*, J. Supramol. Struct., **3**, 426—447 (1975).
111. *Wittmann-Liebold B., Brauer D., Dognin J.*, See [82], pp. 219—232.
112. *Yaun P.-M., Pande H., Clark B. R., Shively J. E.*, Anal. Biochem., **120**, 289—301 (1982).

Глава 17

АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НА МИКРОУРОВНЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗОФАЗНОГО ПЕПТИДНО-БЕЛКОВОГО СЕКВЕНАТОРА

Р. М. ХЕУИК (R. M. HEWICK, *Genetics Institute, 225 Longwood Avenue, Boston, Massachusetts 02115, U.S.A.*), М. У. ХАНКАПИЛЛЕР (M. W. HUNKAPILLER, *Applied Biosystems Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404, U.S.A.*)

17.1. Введение

Автоматическое определение аминокислотной последовательности пептидов и белков по Эдману чаще всего проводят на жидкофазном (ЖФ) секвенаторе с вращающимся реактором [2]. В последние годы существенно усовершенствованы и ЖФ-секвенатор, и методы работы на нем [6, 9, 14—16]. Уделяя особое внимание тщательной очистке реагентов и растворителей, используемых как в секвенаторе, так и в системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) отщепленных производных аминокислот, в настоящее время можно определять протяженные последовательности аминокислот (>30 остатков), располагая количествами пептида (белка) <1 нмоль [7]. Основной недостаток ЖФ-анализа связан с вымыванием образцов, особенно гидрофобных пептидов. Применение полибрена* при анализе последовательности на ЖФ-секвенаторе помогло решить эту проблему [6, 14].

Для устранения потерь с промывками образца был предложен твердофазный (ТФ) метод анализа [11]. Благодаря ковалентному присоединению изучаемого полипептида к химически модифицированной матрице носителя (на основе стекла или полистирола) исключены потери образца при промывке его органическими растворителями в процессе отщепления аминокислот. Простота конструкции колонки-реактора ТФ-секвенатора облегчает ее миниатюризацию, что позволяет повысить чувствительность определения последовательности. В то же время ковалентное присоединение пептидов и белков к носителю в гетерогенной системе не так просто осуществить, а выходы на этой стадии составляют лишь 20—50%. Реакции связывания белка (пептида) с матрицей носителя проводятся вне секвенатора, они весьма трудоемки и требуют длительного времени. Необходимо отметить, что планирование эксперимен-

---

* Полибрен — 1,5-диметил-1,5-диазаундекаметиленполиметобромид. — *Прим. перев.*

та по ковалентному присоединению полипептида до некоторой степени зависит от знания его аминокислотного состава. Существенный недостаток ТФ-метода заключается в том, что из-за пропусков аминокислот в местах связывания полипептида с матрицей получают недостаточно полную информацию об аминокислотной последовательности пептида; кроме того, образец полностью теряется (вымывается из колонки) в случае, когда очередная отщепляемая аминокислота оказывается последней точкой присоединения пептида к носителю.

Недавно был разработан миниатюрный секвенатор нового типа — газофазный, в котором для проведения реакции Эдмана используются газообразные реагенты [4, 8]. Единственными жидкостями, вступающими в контакт с пленкой белка (пептида), являются фенилизотиоцианат и органические растворители, в которых белок плохо растворим. Вымывание гидрофобных пептидов и белков, связанных с додецилсульфонатом натрия (ДСН), предотвращают добавлением полибрена.

Изучаемый пептид наносят на пористый фильтр, который затем высушивают; таким образом получают тонкую пленку образца в реакционной камере ГФ-секвенатора. Пептид очень прочно связан с фильтром, даже не будучи ковалентно присоединенным к нему. Поскольку образец находится в одном и том же физическом состоянии в течение всего процесса определения по Эдману, то вместо громоздкой и сложной в изготовлении системы с вращающимся реактором используют миниатюрный реакционный сосуд проточного типа. Уменьшение размеров реактора ведет к дальнейшему снижению расхода изучаемого материала по сравнению с ЖФ-секвенатором [7]. При работе на ГФ-секвенаторе требуется значительно меньше реактивов, расщепление по Эдману проходит быстрее; конструктивно ГФ-секвенатор устроен проще, чем ЖФ-прибор.

В этой главе рассмотрены наиболее важные конструкционные особенности ГФ-секвенатора, особенности методик, с успехом применяющихся для анализа структуры на микроуровне (<100 пмоль) пептидов, элюированных из ДСН-полиакриламидных гелей (ДСН—ПААГ).

17.2. Секвенатор

Устройство ГФ-секвенатора подробно изложено в работе [4]. Ниже отмечены только некоторые особенности конструкции прибора и работы на нем (рис. 17.1). Существует коммерческий вариант секвенатора (см. прим. ред. в конце главы), который отличается от прототипа следующим:

1) электрическое (вместо пневматического) включение клапанов, подающих реагенты и растворители;

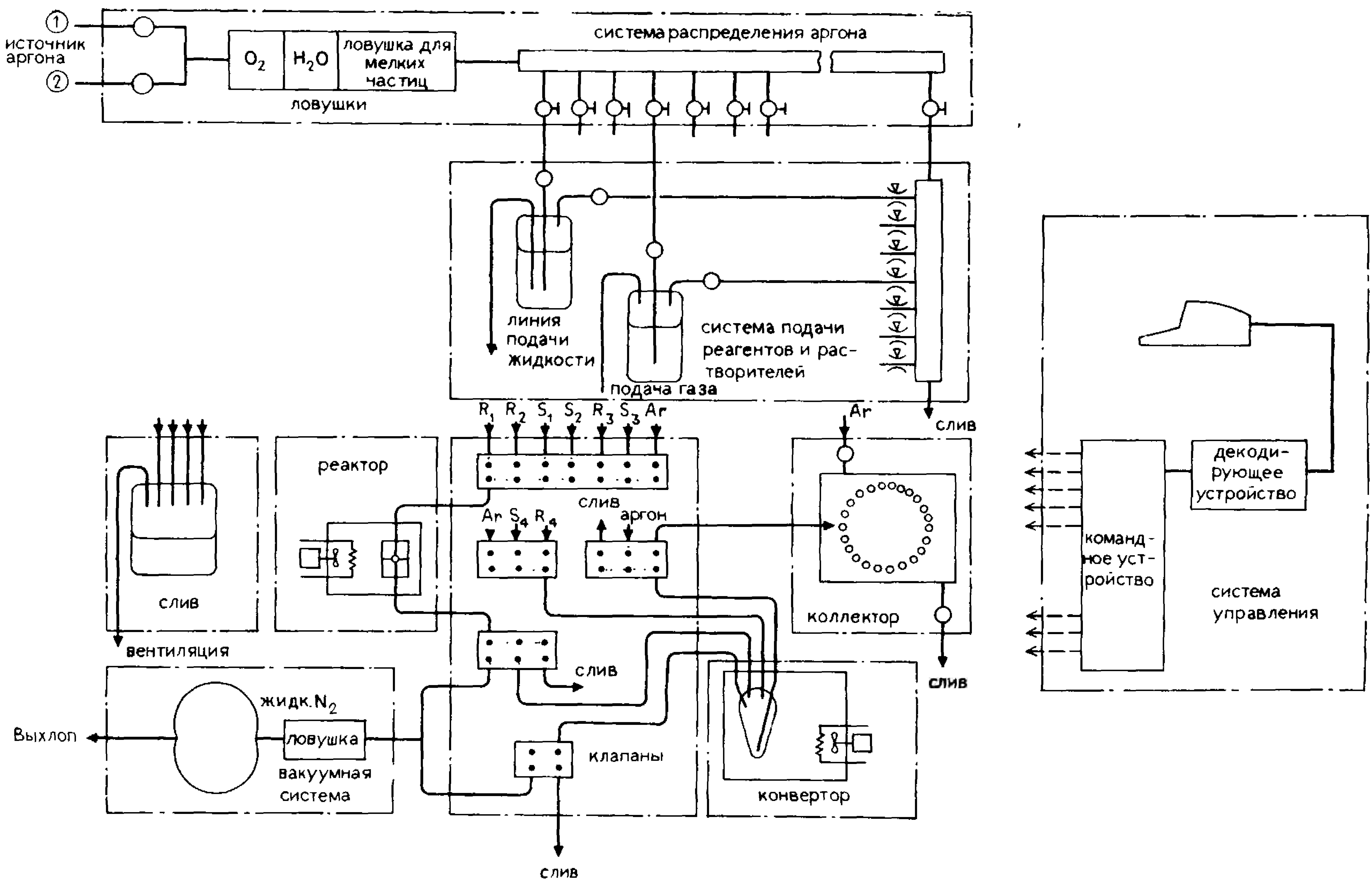


РИС. 17.1. Схема газофазного секвенатора.

2) микропроцессорное управление прибором (вместо программирующего устройства с жестким циклом работы) с возможностью изменения параметров реакции в отдельных циклах (например, можно увеличить время отщепления в тех циклах, где предполагается присутствие остатков пролина).

17.2.1. Реактор

Реактор состоит из двух стеклянных (пирекс) цилиндров (длина 25,4 мм, диаметр 25,4 мм), плоские основания которых (торцы) отшлифованы для обеспечения вакуумно-плотного соединения. По оси цилиндров ультразвуком просверлены капиллярные каналы диаметром 0,508 мм. Последующей обработкой одного торца каждого цилиндра при входе в капиллярный канал делают коническую выемку, так что при соединении двух цилиндров коническими углублениями навстречу друг другу образуется камера малого объема (рис. 17.2). В коническое углубление верхнего стеклянного блока помещают фильтр в виде плоского диска диаметром 12 мм, изготовленный из стекловолокна (фильтр марки GF/C, фирма Whatman). Под стекловолокнистый фильтр кладут тонкий пористый тефлоновый фильтр, который, во-первых, обеспечивает вакуумное уплотнение по периферии реакционной камеры, во-вторых, служит механической подложкой для фильтра из стекловолокна (GF/C). В увеличенном виде реактор в сборке показан на рис. 17.3.

С подробным описанием устройства подающих клапанов, сосудов для реагентов и растворителей, коллектора фракции и конвертора, используемых в секвенаторе, можно ознакомиться в работе [9].

17.2.2. Реагенты и растворители

Примерные расходуемые объемы реагентов и растворителей для ГФ-секвенатора приведены в табл. 17.1. Там же для сравнения указаны соответствующие объемы реактивов для ЖФ-секвенатора [6].

17.2.3. Эксплуатация секвенатора

17.2.3.1. Нанесение образца. Перед нанесением образца реактор (рис. 17.2) разбирают. Для этого откручивают винт *1*, кольцо-фиксатор *8*, вынимают реактор в сборке из основания *9*. Откручивают алюминиевую крышку *3*, вынимают оба стеклянных цилиндра *7* из патрона *6*. Удаляют использованные диски (стеклофильтр и тефлоновый фильтр). Стеклянные цилиндры промывают поочередно водой, 1 М уксусной кислотой, водой, 1 М едким натром, водой, метанолом (марки «для ВЭЖХ»). В торцевую выемку верхнего цилиндра помещают новый стеклофильтр, наносят на него по 0,025 мл водного раствора полибрена (60 мг/мл) и глицилглицина (1 мкм/мл). Затем фильтр сушат в вакууме, между двумя торцевыми поверхностями цилиндров, образующими реакционную камеру, кладут новый тефлоновый фильтр, собирают

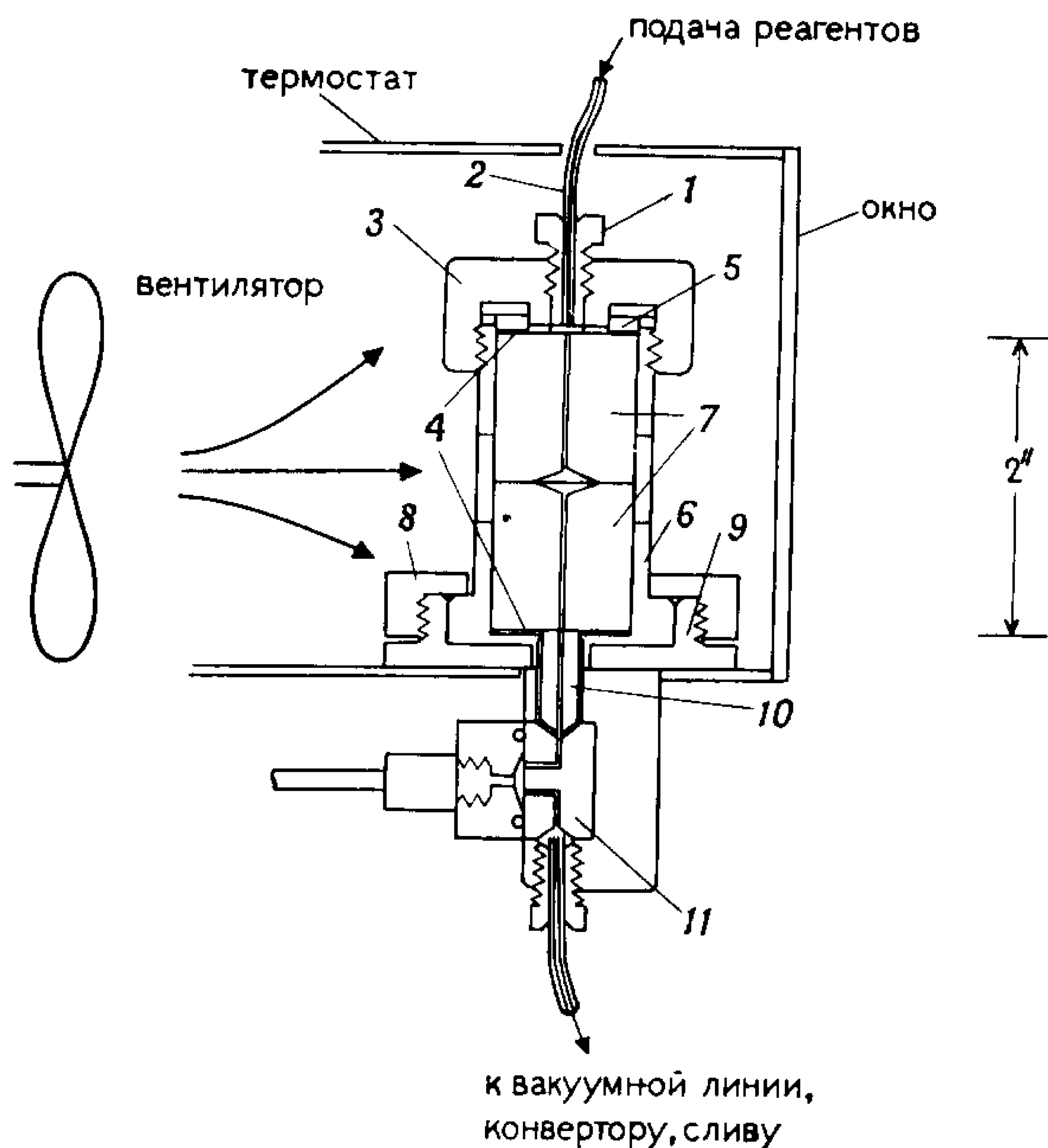


РИС. 17.2. Реактор в сборе.

1 — верхнее уплотнение; *2* — тефлоновая линия; *3* — алюминиевая крышка; *4* — тефлоновая прокладка; *5* — уплотнение; *6* — направляющая гильза (нержавеющая сталь); *7* — стеклянный цилиндр (пирекс); *8* — кольцо-фиксатор; *9* — основание реактора; *10* — нижнее уплотнение; *11* — блок клапанов.

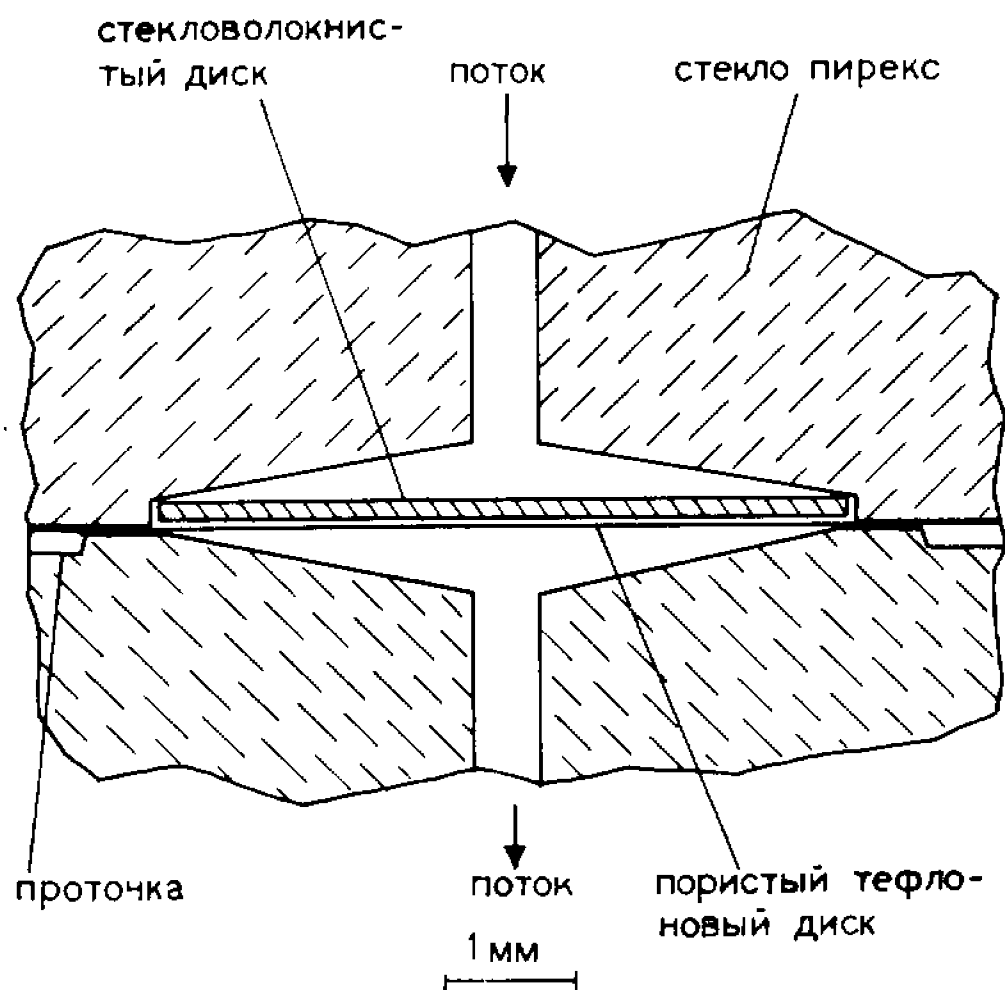


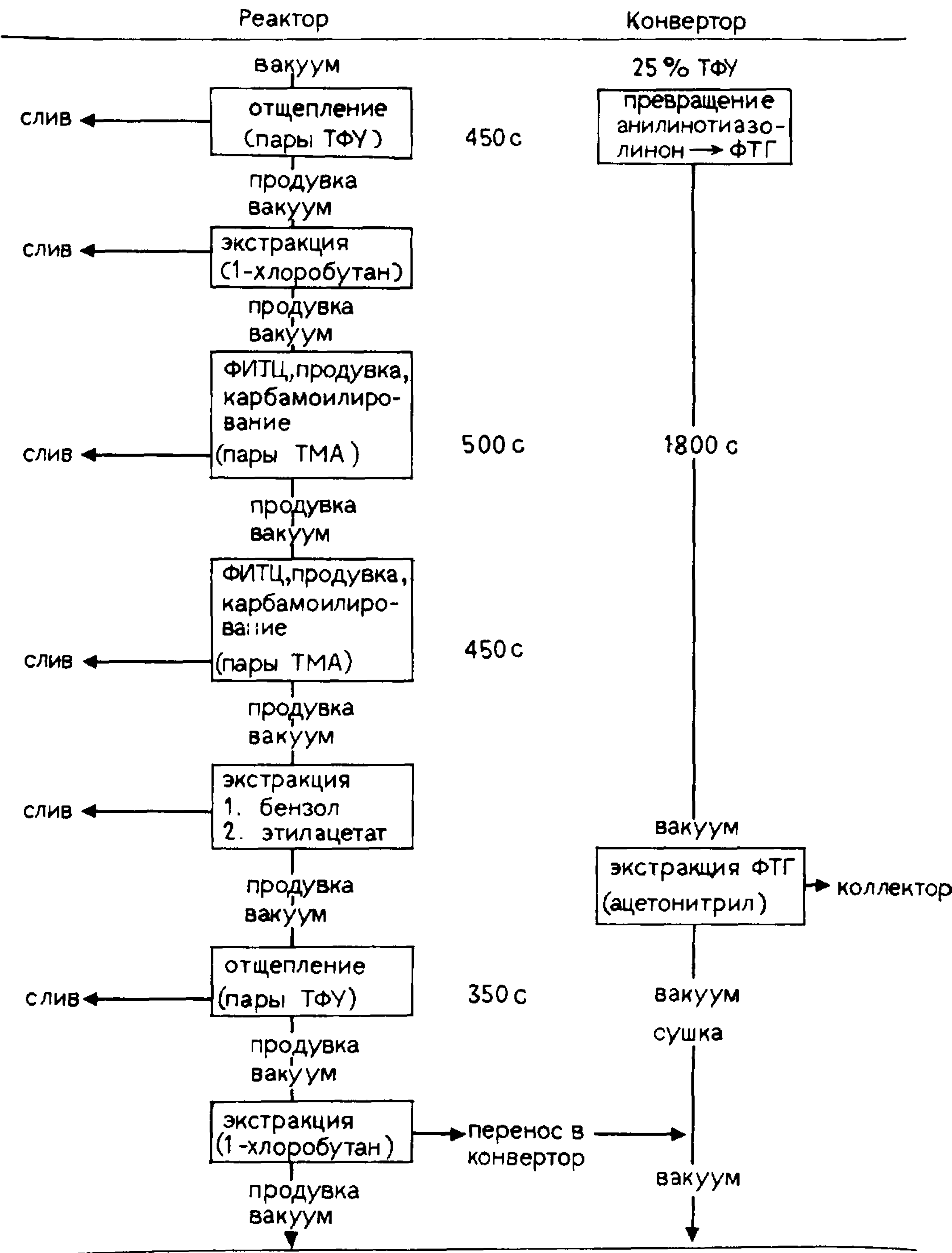
РИС. 17.3. Реакционная камера (увеличенное изображение).

Таблица 17.1. Сравнение расхода реагентов и растворителей при проведении одного цикла отщепления по Эдману на ЖФ и ГФ-секвенаторах

	ЖФ-секвенатор (реагент/растворитель)	Объем, мл	ГФ-секвенатор (реагент/растворитель)	Объем, мл
R_1	ФИТЦ в гептане[а]	0,4	15%-ный ФИТЦ в *н*-гептане[б]	0,05
R_2	Квадрол — ТФУ (pH 9,0) в смеси вода — *н*-пропанол (4 : 3)	0,7	15%-ный водный триметиламин[в]	5 см³/мин (в потоке аргона)
R_3	ГФМК	0,5	ТФУ, содержащая 0,01% дитиотреита[г]	5 см³/мин (в потоке аргона)
R_4	25%-ная водная ТФУ (**расход не** указан)	0,5[д]	25%-ная водная ТФУ, содержащая 0,01% дитиотреита	0,05
S_1	Бензол	7	Бензол[е]	1,1
S_2	Этилацетат, содержащий 0,05% уксусной кислоты и 0,002% дитиотреита	16	Этилацетат, содержащий 0,05% уксусной кислоты и 0,002% дитиотреита	1,2
S_3	1-хлоробутан, содержащий 0,001% дитиотреита	7	1-Хлоробутан, содержащий 0,001% дитиотреита	1,2
S_4	Ацетонитрил, содержащий 0,001% дитиотреита	4	Ацетонитрил, содержащий 0,001% дитиотреита[ж]	0,3[з]

В настоящее время программа работы изменена следующим образом: [а]5%-ный раствор; [б]5%-ный раствор; [в]12,5%-ный раствор; [г]подается не в виде паров, а в жидком состоянии (9 мкл); [д]приведено переводчиком; [е]бензол заменен на *н*-гептан; [ж]20%-ный водный ацетонитрил. — *Прим. перев.* [з]Промывка конвертора не включена в этот объем.

Таблица 17.2. Программа работы газофазного секвенатора



реактор и проводят по крайней мере четыре цикла отщепления. После такой предварительной химической обработки стеклофильтра реактор разбирают, вынимают верхний цилиндр, несущий этот фильтр. Оставляя последний в коническом углублении, переворачивают цилиндр фильтром вверх, наносят на фильтр раствор полипептида (аликвотами по 0,025 мл), сушат фильтр. Собирают реактор и начинают анализ аминокислотной последовательности на секвенаторе.

17.2.3.2. Программа работы секвенатора. Последовательность операций, проводимых на секвенаторе, в основном аналогичная описанной ранее [4] и в общем виде отражена в табл. 17.2. Недавно в программу были внесены следующие изменения:

1) снижена скорость потока этилацетата (за общее время экстракции 250 с добавляется 1,2 мл); анализ фракции элюата с секвенатора методом ВЭЖХ (шкала чувствительности 0,005 ед. опт. плотн.) показал, что такая модификация фактически исключает появление побочных продуктов расщепления по Эдману, поглощающих при длине волны 254 нм;

2) увеличено общее время операции отщепления при 42 °С (от 650 до 800 с).

17.2.3.3. Эксплуатационные возможности. Для оценки возможностей прибора методом ВЭЖХ определяли выходы ФТГ-производных аминокислот (постадийные выходы) для различных количеств апомиоглобина кашалота [4]. Для образцов, содержащих 10 нмоль — 5 пмоль миоглобина (рис. 17.4), выходы составляли: 98% (10 нмоль), 96% (500 пмоль), 94% (50 пмоль) и 92% (5 пмоль). Снижение постадийного выхода, наблюдаемое при уменьшении количества наносимого образца, вероятнее всего, связано с наличием следовых количеств окислителей в реактивах и в самом секвенаторе. На уровне 10 нмоль можно определить последовательность первых 90 остатков миоглобина, на уровне 5 пмоль получены данные о частичной последовательности 22 аминокислот (рис. 17.5). В число остатков, не идентифицированных на уровне 5 пмоль, входят производные аминокислот, хуже других растворимые в 1-хлоробутане (например, ФТГ-His и ФТГ-Arg), и наиболее неустойчивые производные аминокислот (Ser, Thr и Trp).

Возможности секвенатора в отношении коротких гидрофобных пептидов оценивались на примере октапептида ангиотензина II человека (рис. 17.6). Анализируя как 5 нмоль (5 мкг исходного вещества), так и 500 пмоль (0,5 мкг), авторы идентифицировали все восемь отщепленных производных аминокислот. При работе с 50 пмоль того же образца не были обнаружены только два последних остатка — Pro и Phe. Соответствующие хроматограммы ВЭЖХ приведены на рис. 17.7.

17.3. Очистка полипептида для микроанализа

Важное достоинство ГФ-секвенатора заключается в том, что с его помощью можно проводить анализ малых количеств белка, нанесенного в присутствии ДСН. Высокая разрешающая способность ДСН—ПААГ-электрофореза делает этот метод мощным средством выделения в чистом виде труднодоступных белков из сложных смесей, обогащенных многими белками. В данном разделе описаны в деталях оригинальные методики, используемые для анализа последовательности белков, присутствующих в ДСН-гелях лишь в пикомольных количествах.

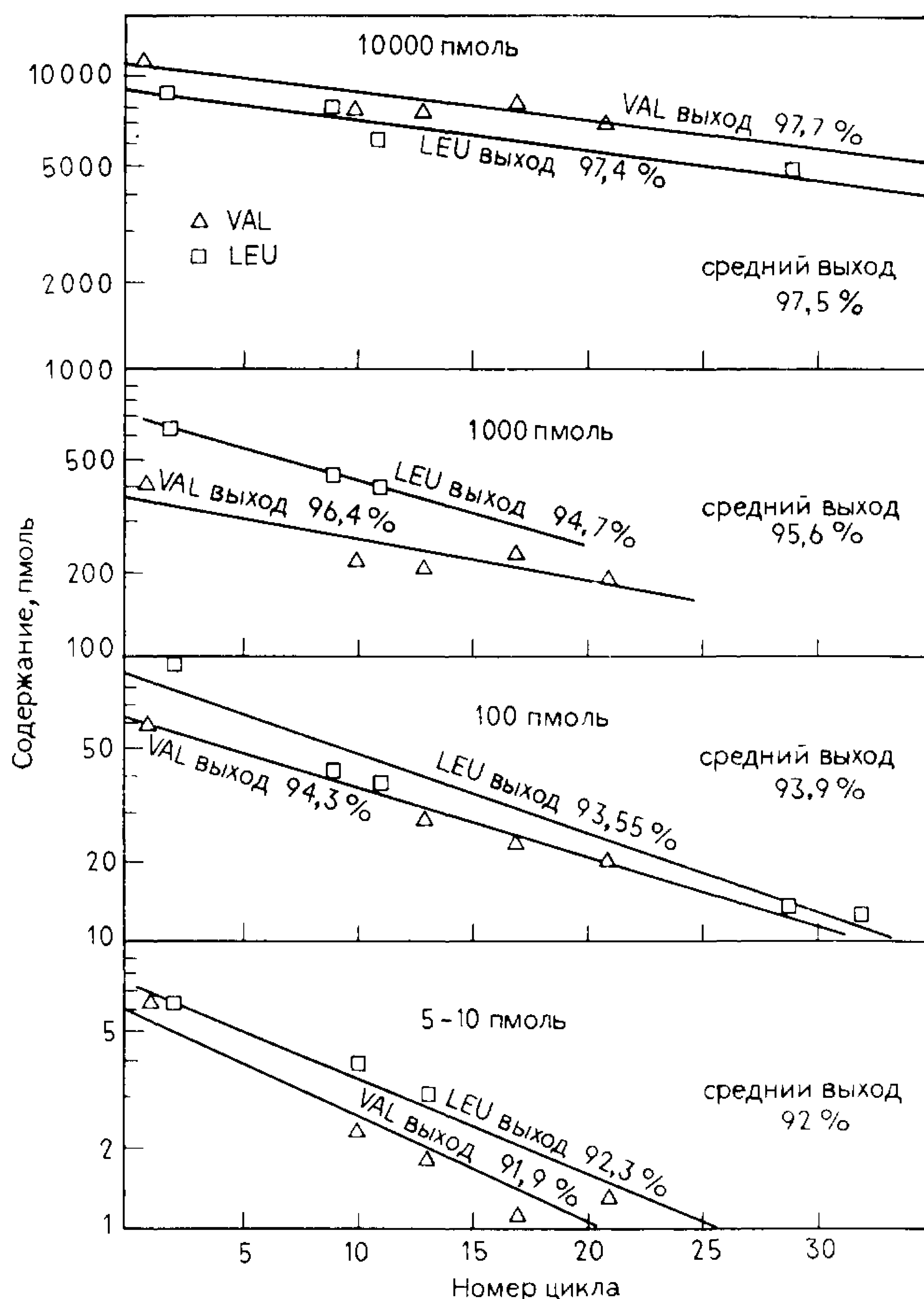


РИС. 17.4. Зависимость постадийных выходов отщепления аминокислот от количества апомиоглобина кашалота. Показаны (в виде полулогарифмических зависимостей) выходы ФТГ-Val (циклы 1, 10, 13, 17, 21), ФТГ-Leu (циклы 2, 9, 11, 29, 32) при использовании 10 нмоль, 1 нмоль, 100 пмоль, 10 пмоль белка. Постадийный выход в каждом цикле рассчитывался по методу наименьших квадратов.

17.3.1. Реактивы и материалы

Использовались акриламид, N,N'-метиленбисакриламид и ДСН фирмы Bio-Rad Laboratories, кумасси бриллиантовый голубой фирмы Serva. Для элюирования и электрофоретического концентрирования белка использовали ДСН, перекристаллизованный из этанола после обработки активированным углем при 50 °С. Качество других реактивов также должно быть наилучшим из всех доступных. Диализные мембраны марки Spectrapor (фирма Spectrum Medical Industries) очищали нагреванием при 60 °С в течение 30 мин последовательно в 1%-ном растворе бикарбоната натрия, дистилли-

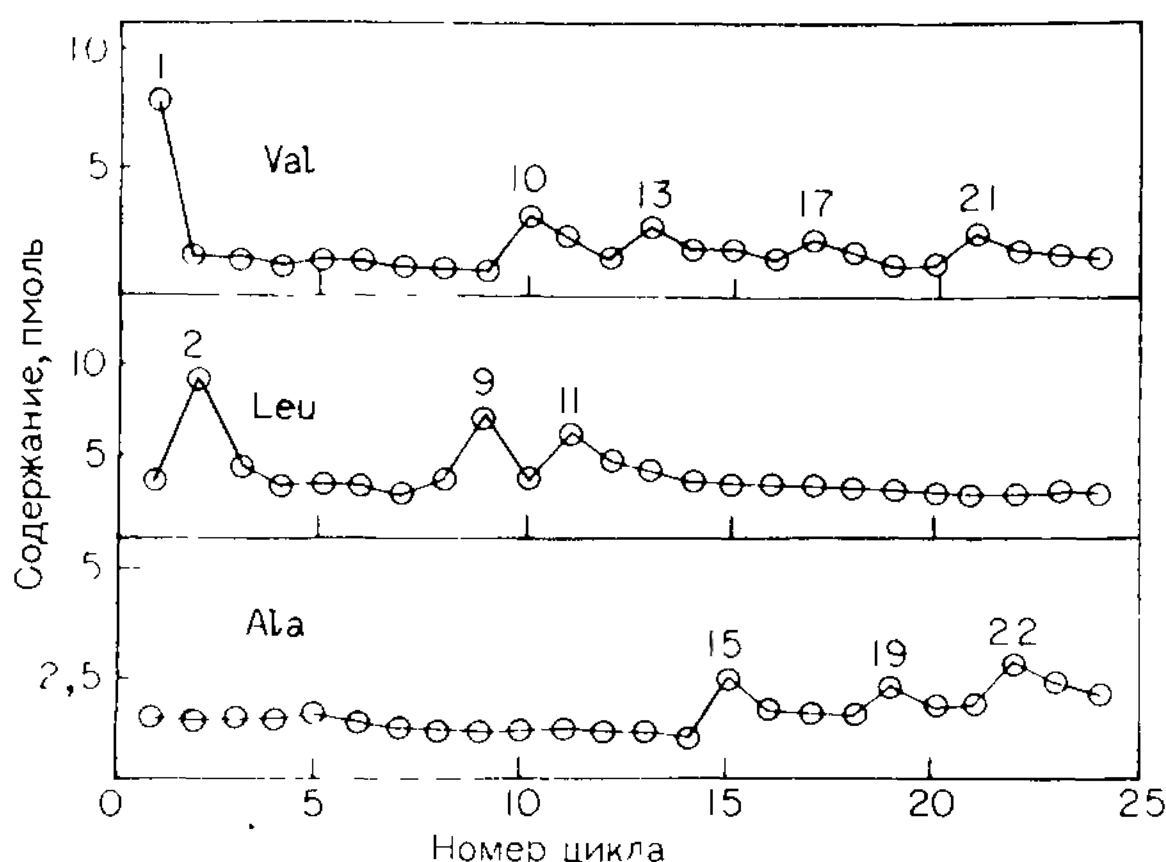


РИС. 17.5. Выходы ФТГ-Val, Leu, Ala при анализе N-концевой последовательности 10 пмоль апомиоглобина кашалота. Для каждого производного выходы нормированы по стандартной смеси ФТГ-производных аминокислот.

рованной воде и 0,1%-ном растворе ДСН. Подготовленные мембраны хранились при комнатной температуре в свежем 0,1%-ном растворе ДСН, содержащем 0,02% азида натрия.

17.3.2. Аппаратура и методика

Для разворачивания полипептидной цепи образец нагревают в течение 5 мин при 80 °С в 0,08 М трис-буфере (pH 6,8), содержащем 2% ДСН, 75 мМ дитиотреит (фирма Calbiochem), 10% (об./об.) глицерина и 0,05% бромотимолового голубого. После охлаждения до комнатной температуры к образцу добавляют тиогликолят натрия до концентрации 5 ммоль/л и проводят ДСН — ПААГ-электрофорез [10]. По завершении электрофореза гели окрашивают в течение 15 мин в растворе, содержащем 20% изопропанола, 10% уксусной кислоты и 0,5% кумасси голубого, затем отмывают при 4 °С в растворе, содержащем 25% метанола и 10% уксусной кислоты. Гель с полосой белка, окрашенного кумасси, вырезают бритвенным лезвием, режут на небольшие кубики, которые оставляют на 1 ч набухать в дистиллированной воде для удаления уксусной кислоты и метанола. Избыток жидкости сливают с геля, оставляют частицы геля набухать в течение 2—16 ч при комнатной температуре в 0,5—1,0 мл раствора 0,2 М бикарбоната аммония, содержащего 1% ДСН и 0,1% дитиотреита. Эта обработка нейтрализует остаточную кислотность и повторно насыщает белок ДСН.

Конструкция электрофоретического элюатора-концентратора включает две камеры из оргстекла для загрузки и концентрирования образца, каждая из которых у дна закрыта диализной мембраной; камеры соединены друг с другом электролитическим мостиком. Прибор по конструкции сходен с коммерческой моделью фирмы Isco, за тем исключением, что меньшая камера (концентрирования) расширена у дна для выравнивания ее диаметра с диаметром большей камеры (загрузки). Это конструктивное решение облегчает концентрирование белка через мембрану меньшей камеры, но вместе с тем ухудшает условия концентрирования ДСН, так как площади поверхности мембран, через которые происходит миграция ионов наружу и вовнутрь элюатора, одинаковы.

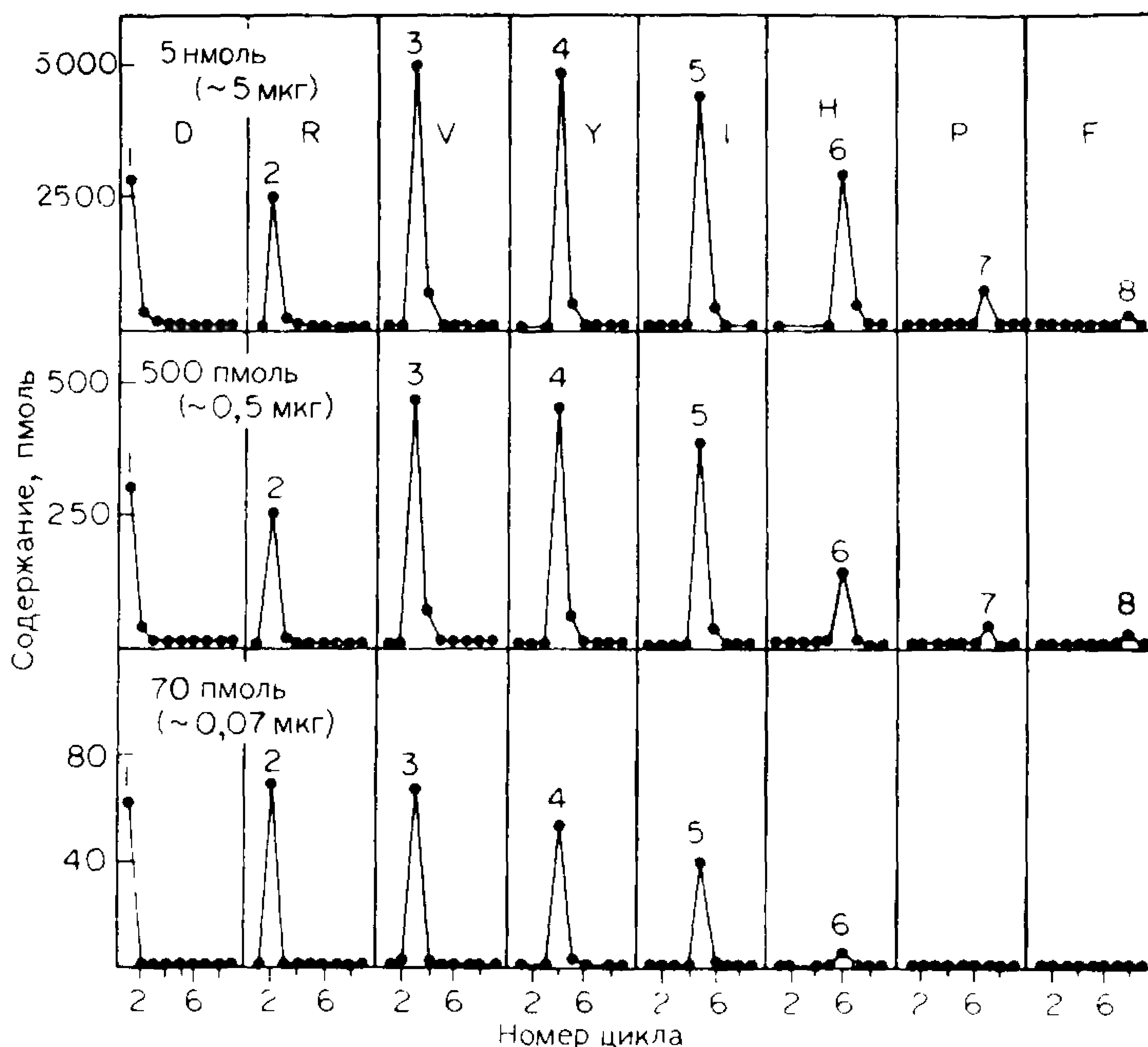


РИС. 17.6. Выходы ФТГ-производных аминокислот при анализе N-концевой последовательности 5 нмоль, 500 и 70 пмоль ангиотензина II (последовательность Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Обработка результатов, как указано в подписи к рис. 17.5.

Частицы геля и уравновешивающий раствор, содержащий 1% ДСН, переносят в загрузочную камеру элюатора. Прибор заполняют 0,05 М бикарбонатом аммония, содержащем 0,1% ДСН и 0,5 мМ тиогликолята натрия. Сосуды для электродов заполняют тем же раствором. Электрофорез проводят в течение 16 ч при напряжении 50 В с рециркуляцией буферного раствора; затем электродный буферный, раствор заменяют раствором 10 мМ бикарбоната аммония, содержащего 0,02% ДСН. Электрофорез продолжают еще 20 ч при напряжении 80 В. При этом элюирующийся белок количественно концентрируется в объеме раствора <100 мкл. Плотную зону кумасси голубого и белка удаляют с диализной мембраны микрошприцем (фирма Hamilton). Затем наносят образец на поверхность стекловолокнистого фильтра секвенатора.

17.4. Обсуждение

17.4.1. Иммобилизация образца и чувствительность прибора

По сравнению с секвенаторами других типов ГФ-прибор позволяет проводить определение аминокислотной последовательности белков (пептидов) на меньшем количестве материала [4].

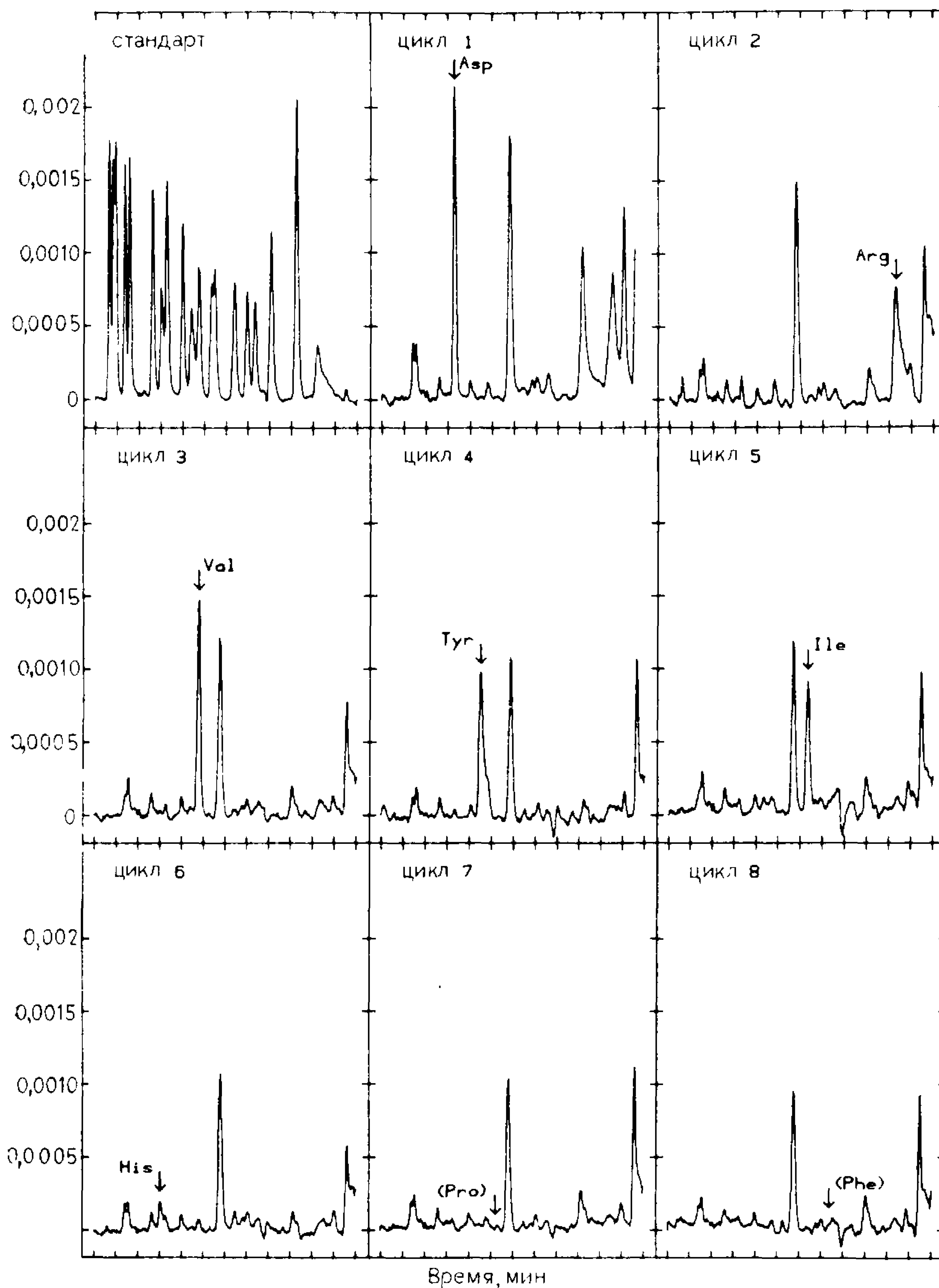


РИС. 17.7. Хроматограммы продуктов отщепления при анализе аминокислотной последовательности 50 пмоль ангиотензина II человека. Чувствительность 0,005 ед. опт. плотн. на шкалу. Хроматограмма записана с помощью системы обработки данных (компьютер 3354, фирмы Hewlett-Packard) с вычитанием базовой линии, полученной в холостом анализе (в инжектор введено 10 мкл ацетонитрила). Порядок элюирования ФТГ-производных аминокислот (12,5 пмоль каждого): Asn, Ser, Thr, Gln, Gly, Ala, His, Asp-O-Me, Glu-O-Me, Tyr, Val, Pro, Met, Ile, Leu, Phe, Trp, Lys, Arg. На колонку введено по 10 мкл раствора (40% каждого образца). Положение и природа аминокислот в циклах 1—6 показано в трехбуквенном обозначении. Положение ожидаемых ФТГ-производных аминокислот в циклах 7 и 8 показано таким же образом, хотя они и не обнаружены в эксперименте.

Это преимущество обусловлено эффективной иммобилизацией образца в ходе расщепления по Эдману даже в отсутствие ковалентного присоединения к твердофазному носителю. Пептид (белок) остается устойчиво связанным с фильтром по следующим причинам:

1) и основание (триметиламин — вода, реакция присоединения ФИТЦ), и кислота (ТФУ), реакция отщепления тиазолинона) подаются в раствор в газообразном состоянии;

2) образец закрепляется в пленке полибрена, что придает ему устойчивость к вымыванию органическими растворителями (бензол, этилацетат, 1-хлоробутан), используемыми для удаления избытка реагентов, основных и побочных продуктов реакций. Поскольку после нанесения на стекловолокнистый фильтр белок (пептид) связывается с фильтром, образующим рабочую поверхность реактора путем простого высушивания, то исключены начальные потери образца, присущие неэффективным методам ковалентного присоединения полипептида к носителю. То обстоятельство, что образец остается иммобилизованным в ходе повторяющихся циклов отщепления, дает возможность существенно уменьшить объем реакционной камеры, выполненной в виде небольшого стеклянного патрона. В отличие от ЖФ-секвенатора в ГФ-приборе для поддержания образца в виде тонкой пленки не требуется вращения реактора, так как полипептид перед анализом нанесен и высушен в виде пленки, которая остается нерастворенной в течение всех последующих процессов и не теряет своей формы. Проточный вариант конструкции реакционной ячейки позволяет избежать жестких требований к точности дозировки реагентов и растворителей. Реакции присоединения ФИТЦ и отщепления тиазолинонов происходят при подаче триметиламина (ТМА) и ТФУ в газовой фазе. Единственный реактив, требующий точной дозировки, это ФИТЦ, который должен добавляться в количестве, обеспечивающем полное смачивание фильтра с образцом.

Использование пористого фильтра и проточного принципа проведения процесса позволяет проводить высокочувствительный анализ при низком уровне химического фона. Диск представляет собой сетку из переплетенных волокон, имеющую сильно развитую поверхность, на которой находится высушенная газо- и жидкостнопроницаемая пленка, состоящая из белка и полибрена. Кроме того, благодаря малой толщине пористого диска создается низкое сопротивление потоку жидкости. Это обеспечивает максимальный массообмен реактивов и растворителей с образцом. При малых скоростях потока можно достичь высокой эффективности и химических реакций, и экстракций, что позволяет экономно расходовать дорогостоящие реагенты и растворители (табл. 17.1).

При использовании малых объемов жидкостей сводится к минимуму и содержание примесей, присутствующих даже в ультрачистых реактивах и имеющих поглощение при длине волны детекции ФТГ-производных аминокислот (254 нм). При анализе последовательности на микроуровне (<100 пикомоль исходного материала) надежность интерпретации хроматограмм ВЭЖХ в значительной степени зависит от возможности получения стабильной и воспроизводимой базовой линии при длине волны 254 нм (рис. 17.7).

17.4.2. Химические аспекты

Недавно было показано, что на стадии присоединения ФИТЦ к аминогруппе пептида вместо паров водного ТМА можно использовать пары безводного ТМА без заметного влияния на постадийный выход, чувствительность анализа и уровень фона (*C. P. Hewick*, *M. Hunkapiller*, неопубликованные данные). Безводное основание применяли при анализе как коротких пептидов, так и белков. Аминокислотный фон, полученный при определении последовательности миоглобина в полностью безводных условиях оказался не меньшим, чем при проведении процесса с обычным водным раствором ТМА. Эти результаты указывают, что появление фона аминокислот в ГФ-приборе вызвано в основном не гидролизом пептидной связи, а другими химическими реакциями, как предполагалось ранее и для системы с вращающимся реактором [1].

17.4.3. Количество анализируемого образца

Представительный список исследованных образцов приведен в табл. 17.3. В настоящее время минимальное количество материала, необходимое для получения полезной информации о последовательности, составляет 5—10 пмоль (0,05—0,1 мкг) в случае белка среднего размера и 50 пмоль (0,05 мкг) для короткого пептида. Секвенирование сильно гликозилированных белков, таких, как эритропоэтин (60% углеводов), до сих пор не представляло особых проблем, хотя необходимо увеличивать время отщепления аминокислот, стоящих в цепи как до, так и после гликозилированного остатка, для сведения к минимуму содержания остаточных аминокислот, вызванного неполнотой отщепления предыдущих. Аналогичным образом поступают в случае последовательностей, содержащих пролин, сопровождаемый аминокислотными остатками, имеющими объемные боковые цепи (Lys, Arg, Leu в нейропептиде В из *Aplysia*).

Пожалуй, наиболее важное преимущество ГФ-секвенатора состоит в том, что, он позволяет анализировать следовые коли-

Таблица 17.3. Пептиды, анализированные на ГФ-секвенаторе

Анализируемый образец	Отношение числа идентифицированных остатков к общему числу остатков	Количество	
		пмоль	мкг
Ангиотензин	8/8	500	0,5
Ангиотензин	6/8	50	0,05
Соматостатин	14/14	1400	2,0
B-цепь инсулина	30/30	300	1,0
Нейропептид B из *Aplysia*	31/34	500	2,0
Динорфин	14/17	20	0,04
Миоглобин	90/153	10 000	165
Миоглобин	22/153	5	0,08
Белок 1 кутикулы личинки дрозофилы[а]	55/166	850	15
Белок 3 кутикулы личинки дрозофилы[а]	36/96	900	9
Мембранный фосфопротеин (M $22\cdot10^3$) из *Aplysia*[б]	23/200	15	0,3
Фактор роста Т-клеток человека[б]	15/160	25	1,0
α-цепь антигена HLA-DR гистосовместимости человека	49/300	700	23
β-цепь антигена HLA-DR гистосовместимости человека	39/240	500	13
Эритропоэтин человека[в]	28/150	100	1,6
Антиген поверхности клетки меланомы человека[в]	13/850	60	5,5

[а] Очищен электрофокусированием в ПААГ, содержащем мочевину. [б] Элюирован электрофоретически из ДСН — ПААГ, окрашенного кумасси голубым. [в] 60% углеводов по массе.

чества полипептидов, выделенных электрофорезом в полиакриламидных гелях в присутствии ДСН и элюированных из окрашенных гелей (антиген клеточной стенки меланомы, мембранный фосфопротеин из *Aplysia*, интерлейкин II или фактор роста Т-клеток).

17.4.4. Прогнозы

Сегодня в тех случаях, когда исследуемый белок может быть очищен лишь в следовых количествах, главным ограничением для получения данных об аминокислотном составе и последовательности аминокислот является качество выделенного образца. Во многих случаях, когда выход белка после очистки составляет 10—100 пмоль, существует большое расхождение между количеством материала, определенным по данным аминокислотного анализа, и количеством белка, оцененным по выходу первого ФТГ-производного аминокислоты. Такого различия в оценке содержания анализируемого объекта не наблюдается, когда имеют дело со следовыми количествами белка, взя-

того из большой навески чистого материала, и оно, вероятнее всего, отражает частичное блокирование N-концевых аминокислот, происходящее при выделении образца. В случае электрофоретического выделения полипептидов в ДСН—ПААГ минорные белковые компоненты можно защитить от окислительных модификаций добавлением восстановителей в наносимые образцы.

Снижение постадийных выходов, связанное с уменьшением количества носимого образца (рис. 17.4), является веским доказательством наличия следовых количеств окислителей в секвенаторе, даже если все реагенты и растворители были тщательно очищены. Предварительные результаты указывают на то, что еще более тонкая очистка всех реактивов и блокирования окислителей добавлением в растворители больших количеств восстанавливающих агентов, таких, как дитиотреит, может улучшить постадийные выходы при нанесении очень малых количеств образца.

Методически наиболее перспективно совместное использование высокой разрешающей способности ДСН—ПААГ-электрофореза и анализа последовательности аминокислот на ГФ-секвенаторе. В настоящее время можно получить частичную аминокислотную последовательность белка, полоска которого при окрашивании кумасси голубым едва видна в геле и который может представлять собой редко экспрессируемый компонент клетки. Данные о частичной аминокислотной последовательности такого белка можно использовать для синтеза олигонуклеотидных праймеров (зондов), необходимых для клонирования кДНК, комплементарной мРНК, с которой транслируется белок [12]. Этот подход уже использовался для клонирования труднодоступных генов интерферонов [5] и антигена гистосовместимости человека [13].

От редактора. Коммерческий прибор (модель 470А фирмы Applied Biosystems) испытывался в процессе микроаналитического определения последовательности. Серийные анализы с использованием 1 нмоль миоглобина после проведения 22 циклов отщепления дали среднее значение начального и постадийного выходов 24,7±4,9% и 96,1±1,9%, (n=5) [3]. Фирма Applied Biosystems регулярно выпускает Users Bulletin, содержащий много полезной информации о всех аспектах анализа аминокислотной последовательности белка.

Литература

1. *Brandt W. E., Henschen A., Holt C. vom*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **361**, 943—952 (1980).
2. *Edman P., Begg G.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80—91 (1967).
3. *Esch F. S.*, Anal. Biochem., **136**, 39—47 (1984).
4. *Hewick R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W. J.*, J. Biol. Chem., **256**, 7990—7997 (1981).

5. *Houghton M., Eaton M. A. W., Stewart A. G., Smith J. C., Doel S. M., Catlin G. H., Lewis H. M., Patel J. P., Entage J. S., Carey N. H., Porter A. G.,* Nucleic Acids Res., **8**, 2885—2890 (1980).
6. *Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Biochemistry, **17**, 2124—2133 (1978).
7. *Hunkapiller M. W., Hood L. E.*, Science, **207**, 523—525 (1980).
8. *Hunkapiller M. W., Hewick R. M., Dreyer W. J., Hood L. E.*, Methods Enzymol., **91**, 399—413 (1983).
9. *Klapper D. G., Wilde C. E., III, Capra J. D.*, Anal. Biochem., **85**, 126—131 (1978).
10. *Laemmli U. K.*, Nature (Lond.), **227**, 680—684 (1970).
11. *Laursen R. A.*, Eur. J. Biochem., **20**, 89—102 (1971).
12. *Noyes B. E., Mevarech M., Stein R., Agarwal K. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, **76**, 1770—1774 (1979).
13. *Sood A. K., Pereira D., Weissman S. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **78**, 616—620 (1981).
14. *Tarr G. E., Beecher J. F., Bell M., McKean D. J.*, Anal. Biochem., **84**, 622—627 (1978).
15. *Wittmann-Liebold B.*, In: Polypeptide Hormones, Beers R. F., Jr., Basset E. G. (Eds.), Raven Press, New York, pp. 87—120 (1980).
16. *Wittmann-Liebold B., Graffunder H., Kohls H.*, Anal. Biochem., **75**, 621—633 (1976).

Глава 18

ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ

К. У. УАРД (С. W. WARD, *Division of Protein Chemistry, CSIRO, Parkville, 3052 Victoria, Australia*)

18.1. Введение

В то время как главные достижения в структурном анализе белка обязаны методу N-концевого отщепления аминокислот по Эдману, а применение автоматических секвенаторов позволило определить протяженные (40—70 остатков) последовательности аминокислот, структурный анализ белков с С-конца до сих пор находится в неудовлетворительном состоянии. Несмотря на бесспорную необходимость решения этой проблемы и большие усилия в этом направлении, ощутимых успехов пока не достигнуто.

Установление последовательности с С-конца требуется при определении структуры пептидов и белков в тех случаях, когда в изучаемых объектах N-концевая аминокислота блокирована уже в исходном природном материале (формильной, ацетильной или пироглутамильной группой) или в результате химических реакций, протекающих при расщеплении белка или фракционирования полипептидов; к таким реакциям относятся карбамоилирование [85], циклизация N-концевого глутамина в пироглутаминовую кислоту [8], образование иминотиазолинона при расщеплении по остатку цианоцистеина [20, 40], образование циклического амида из N-концевого S-карбоксиамидометил- или S-карбоксиметилцистеина [80], O→N-ацильная миграция с гидроксильных функций N-концевых Ser и Thr [81], перегруппировка аспарагинилглициновых последовательностей [10, 43].

Надежные методы С-концевого анализа необходимы не только для определения ограниченных последовательностей аминокислот отдельных пептидов. Для широкого применения быстрых методов определения последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белки, все чаще и сильнее ощущается потребность в знании как N-, так и С-концевых последовательностей соответствующих белков. Такие данные необходимы для правильного расположения инициирующего кодона и счи-

тывающей рамки; для того чтобы разобраться в проблемах перекрывающейся экспрессии различных генных продуктов, считываемых с одной и той же последовательности нуклеиновых кислот в пределах одной и той же или же разных рамок считывания [5, 24], а также для того, чтобы определить, произошла ли протеолитическая модификация больших молекул предшественников. Объем необходимой информации о последовательности аминокислот белка зависит от типа нуклеиновой кислоты, структура которой определяется (мРНК или геномная ДНК). Если исходным материалом для анализа последовательности является мРНК, то достаточно ограниченной информации о N- и С-концевой последовательностях белка, так как кодирующая последовательность транслируемой области мРНК при считывании точно соответствует аминокислотной последовательности белка [56]. Однако при получении последовательности нуклеотидов геномной ДНК может потребоваться значительно больше данных о структуре белка, так как последовательность оснований, кодирующих конечный белок, может быть не беспрерывной, но включать большие участки нетранслируемой последовательности (интроны), которые затем проявляются на уровне мРНК [6, 16, 24, 52, 73].

В этой статье сделан обзор методик целенаправленного выделения С-концевых пептидов, которые затем можно изучать обычными методами N- и С-концевого анализа последовательности и(или) методом определения только одной С-концевой аминокислоты. В то время как методы преимущественного выделения С-концевых пептидов и идентификации С-концевых остатков развиты достаточно хорошо, методы прямого анализа С-концевой последовательности аминокислот практически вообще отсутствуют и в настоящее время не существует методик, обеспечивающих высокие постадийные выходы, определение протяженных последовательностей и сравнимых по эффективности с результатами N-концевого анализа по Эдману.

18.2. Выделение и идентификация С-концевых пептидов

Для выделения и идентификации С-концевых областей белков и пептидов предложено несколько методик. Все эти методики обеспечивают избирательное отделение С-концевого пептида от всех других пептидов методами ВЭЖХ, ионообменной хроматографии, двумерного высоковольтного электрофореза или специфического связывания ТФ-носителями.

18.2.1. Методики ионообменной хроматографии

Маловероятно, чтобы описанные ниже методики получили широкое распространение; к ним будут обращаться в особых случаях. Предпринималась попытка локализовать С-концевой пеп-

тид β-галактозидазы путем трипсинолиза малеилированного (для расщепления только по остаткам Arg) белка, последующего малеилирования смеси пептидов и пропускания ее через дауэкс-50 при pH 3—4 [100]. При этом полагалось, что все пептиды, за исключением С-концевого, заряжены положительно (благодаря наличию остатков Arg) и поэтому должны задерживаться на колонке (связываться с ионообменной смолой); один лишь незаряженный С-концевой пептид проходит через колонку без задержки. На практике этот подход оказался неудачным, так как С-концевой пептид β-галактозидазы при кислых значениях pH нерастворим. Этот метод неприменим к белкам, имеющим С-концевой Arg или содержащим в составе С-концевого пептида последовательность Arg-Pro или остаток His.

С-Концевые пептиды А-цепи инсулина, лизоцима, цитохрома *c*, трипсина выделяли после блокирования всех свободных карбоксильных групп глициламидом при помощи водорастворимого карбодиимида (1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид, ЭДК) и расщепления полипептидов трипсином [33]. Все триптические пептиды, за исключением блокированного С-концевого, содержали свободные карбоксильные группы и присоединялись к анионообменной смоле AG-1-X2 (фирма Biorad). Перед хроматографией гидролизат обрабатывали карбоксипептидазой В, так как положительно заряженные Arg-содержащие пептиды не связывались со смолой и элюировались вместе с С-концевым пептидом. Свободный Arg отделяли от С-концевого пептида гель-фильтрацией или катионообменной хроматографией. Несмотря на то что эта многостадийная методика представляется продолжительной, ее рекомендуют как простую и довольно быструю.

18.2.2. Твердофазные смолы

Создание твердофазных носителей для анализа последовательности [55] стимулировало разработку мощного метода селективного выделения С-концевых пептидов. В принципе можно селективно присоединить белок к смоле через С-концевой карбоксил белка, химически или ферментативно расщепить иммобилизованный белок и селективно выделить С-концевой пептид, поскольку после гидролиза только он останется присоединенным к смоле. Однако на практике при активации С-концевого карбоксила активируются и карбоксильные группы боковых цепей Asp и Glu, которые затем связываются с носителем [51], что ограничивает возможности использования таких смол в качестве общего метода селективного выделения С-концевых фрагментов белков.

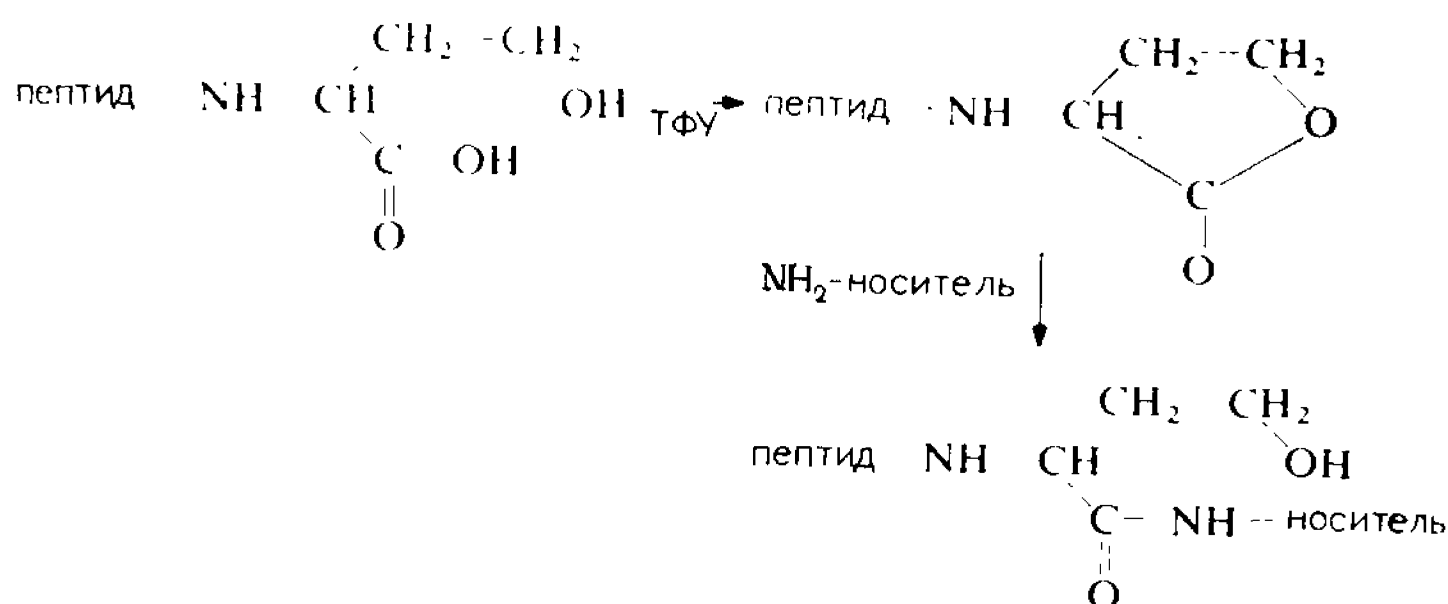


РИС. 18.1. Методика избирательного присоединения к носителю пептидов бромоцианового гидролизата. В присутствии ТФУ остаток HSer превращается в лактон HSer. При аминолизе лактона пептид конденсируется с носителем.

Расщепление белков бромцианом с последующей конденсацией HSer-содержащих пептидов на твердофазном носителе лежит в основе селективного выделения HSer-содержащих пептидов из смесей. Метод включает лактонизацию остатков HSer обработкой ТФУ и последующий аминолиз HSer-лактона путем взаимодействия с аминогруппами смолы [37] (рис. 18.1).

HSer-содержащие пептиды с высоким выходом присоединяются к носителю карбоксильной группой пептида без предварительной защиты N- или С-концевых аминокислот. Этот метод можно использовать для отделения С-концевых HSer-содержащих пептидов из ферментативных гидролизатов крупных бромциановых пептидов [51], а также для удаления HSer-содержащих пептидов от С-концевого пептида, в котором отсутствует эта аминокислота [37]. Присоединение очень больших бромциановых пептидов может быть затруднено (малые выходы) из-за их плохой растворимости.

18.2.3. Двумерное пептидное картирование

До настоящего времени предложено несколько методов пептидного картирования. С-концевой пептид γ-цепи фетального гемоглобина идентифицировали, сравнивая электрофореграммы триптических гидролизатов после повторного разделения (pH 6,5) в направлении, перпендикулярном первому, до и после удаления С-концевых остатков Arg или Lys при помощи карбоксипептидазы В прямо на листе бумаги [63]. Теоретически после обработки карбоксипептидазой на диагонали должен быть только С-концевой пептид. Однако в случае γ-цепи гемоглобина человека на диагонали оказались 3 пятна, а именно свободный Lys, дипептид Val-Lys (так как дипептиды очень медленно расщепляются карбоксипептидазой [46]) и ожидае-

мый С-концевой пептид Tyr-His. Этот метод удобен для белков, у которых С-концевой аминокислотой является любой остаток, кроме Arg и Lys, а также для тех белков, триптические пептиды которых легко расщепляются карбоксипептидазой В.

Для обнаружения С-концевой области А-белка бактериальной триптофансинтетазы сравнивали карты трипсинолиза белка до и после обработки его смесью карбоксипептидаз А и В [15]. С-Концевая последовательность этого белка имеет состав Ala-Ala-Thr-Arg-Ser, и при частичном триптическом гидролизе на пептидной карте обнаруживаются три пятна, соответствующие Ala-Ala-Thr-Arg-Ser, Ala-Ala-Thr-Arg и свободному Ser. После обработки карбоксипептидазами исчезает только пятно Ala-Ala-Thr-Arg, потому что второй пептид и свободный Ser мигрируют на хроматограмме, сливаясь с другими пятнами. Успешное использование этого метода сильно зависит от полноты разделения пептидов на хроматограмме. Чем крупнее молекула белка, тем больше вероятность того, что будет потерян С-концевой пептид.

Из всех использованных методов пептидного картирования наиболее элегантным является метод диагонального электрофореза (ЭФ), основанный на отсутствии свободной карбоксильной группы в амидированных белках. Перед ферментативным расщеплением амидируют карбоксильные группы боковых цепей и С-концевой аминокислоты. После гидролиза С-концевой фрагмент оказывается единственным, не имеющим свободного карбоксила. Его можно селективно идентифицировать, так как его ионный заряд, а следовательно, и электрофоретическая подвижность почти одинаковы при изменении pH в любую сторону от pH 3,5 (рK α-карбоксильной группы). Подвижности пептидов, содержащих свободную карбоксильную группу, увеличатся при подкислении раствора ($pH<3{,}5$). После двумерного ЭФ на диагонали электрофореграммы обнаруживается только С-концевой пептид.

В оригинальной методике [27] белок амидировали метиламином при помощи *п*-толуолсульфоната N-циклогексил-N′-2-(4-β-морфолинил)этилкарбодиимида; проводили ферментативное расщепление, гидролизат подвергали высоковольтному ЭФ при pH 6,5 в первом направлении и pH 1,8 — во втором. При этих условиях не обнаруживаются С-концевые пептиды, содержащие His, так как они сходят с диагонали. В модифицированной методике эта проблема снимается проведением ЭФ в первом направлении при pH 4,4; поэтому при проведении разделения в перпендикулярном направлении при pH 1,8 карбоксильные группы оказываются единственными, изменившими свой заряд [22]. Для амидирования белка использовали этаноламин, так как он легко растворим в воде, улучшает раство-

римость модифицированного белка и получаемых пептидов; он отсутствует в обычных белках и поддается количественному определению на аминокислотном анализаторе. В работе [22] при определении точного положения веществ, располагающихся на диагонали независимо от небольших изменений абсолютной подвижности или влияний электроосмоса, использовали в качестве маркеров амид Ala или таурин.

18.2.3.1. Выделение С-концевых пептидов. Ниже приведена методика выделения карбоксилсодержащих концевых пептидов α- и β-цепей гемоглобина человека [22]. Количество белка, необходимое для анализа, зависит от чувствительности метода обнаружения.

Амидирование. Белок (1,6 мкмоль, 50 мг) растворяют в 3 мл воды, содержащей несколько капель соляной кислоты. Добавляют 2,6 г мочевины, перемешивают 30 мин. Добавляют 0,3 г хлорида калия и 0,2 мл этаноламина, pH немедленно доводят до 4,75 при помощи соляной кислоты. Прибавляют 125 мг ЭДК, поддерживают pH 4,75. Перемешивают при комнатной температуре 4—6 ч, затем добавляют 1 мл 4 *М* ацетата натрия (pH 4,75). Раствор диализуют, несколько раз меняя воду.

По другой методике амидирование можно проводить в насыщенном растворе солянокислого гуанидина (1 мл), содержащем этаноламин (20 мкл, 300 мкмоль), при pH 4,7 (с помощью микрошприца добавляют 1 *М* соляную кислоту) [21]. При перемешивании добавляют карбодиимид (ЭДК, 15 мг, 80 мкмоль), поддерживают pH 4,7 в течение 6 ч.

Ферментативное расщепление. Термолитическое расщепление проводят в 1%-ном водном бикарбонате аммония при 37 °С в течение 8 ч при соотношении фермент : субстрат = 1 : 35 (по массе). Для прерывания расщепления реакционную смесь лиофилизуют.

Выделение пептидов путем электрофореза. Смесь пептидов растворяют в буфере пиридин — уксусная кислота — вода (6 : 10 : 1200, pH 4,4), наносят полосой в 330 мм на хроматографическую бумагу ватман 3 ММ вместе с маркерами (амид Ala и таурин, 5 нмоль/мм) и подвергают электрофорезу при pH 4,4 в течение 60 мин при напряжении 6 В/мм; бумагу высушивают. Для проведения аналитического опыта вырезают полосу, содержащую пептиды, пришивают ее к целому листу бумаги ватман 3 ММ и проводят ЭФ при pH 2,1 (муравьиная кислота — уксусная кислота — вода, 1 : 4 : 45) в течение 40 мин при 6 В/мм. Электрофореграмму окрашивают Cd-нингидриновым раствором (разд. 8.14.2). На электрофореграмме, приведенной на рис. 18.2, видно, что на диагонали, ограниченной маркерами, находятся два пептида. (В препаративном опыте после проведения ЭФ при pH 4,4 можно вырезать область на диагонали, содержащую два пептида, и привести ЭФ при pH 2,1.) Пептиды, движущиеся медленнее других и соответствующие двум «диагональным» пептидам, вырезают и при необходимости дополнительно очищают ЭФ при pH 2,1 или 6,5.

Эту методику недавно использовали для определения положения расщепления молекулы гемагглютинина вируса гриппа протеолитическим ферментом бромелаином при ферментативном отщеплении белка от поверхности вируса [21].

Предполагается, что этот метод должен стать широко распространенным [22]. Все пептиды, полученные из С-концевой области белка, располагаются на диагонали независимо от их аминокислотной последовательности. При гидролизе можно использовать любой фермент при условии, что в гидролизате окажутся пептиды достаточной длины, а определение последовательности

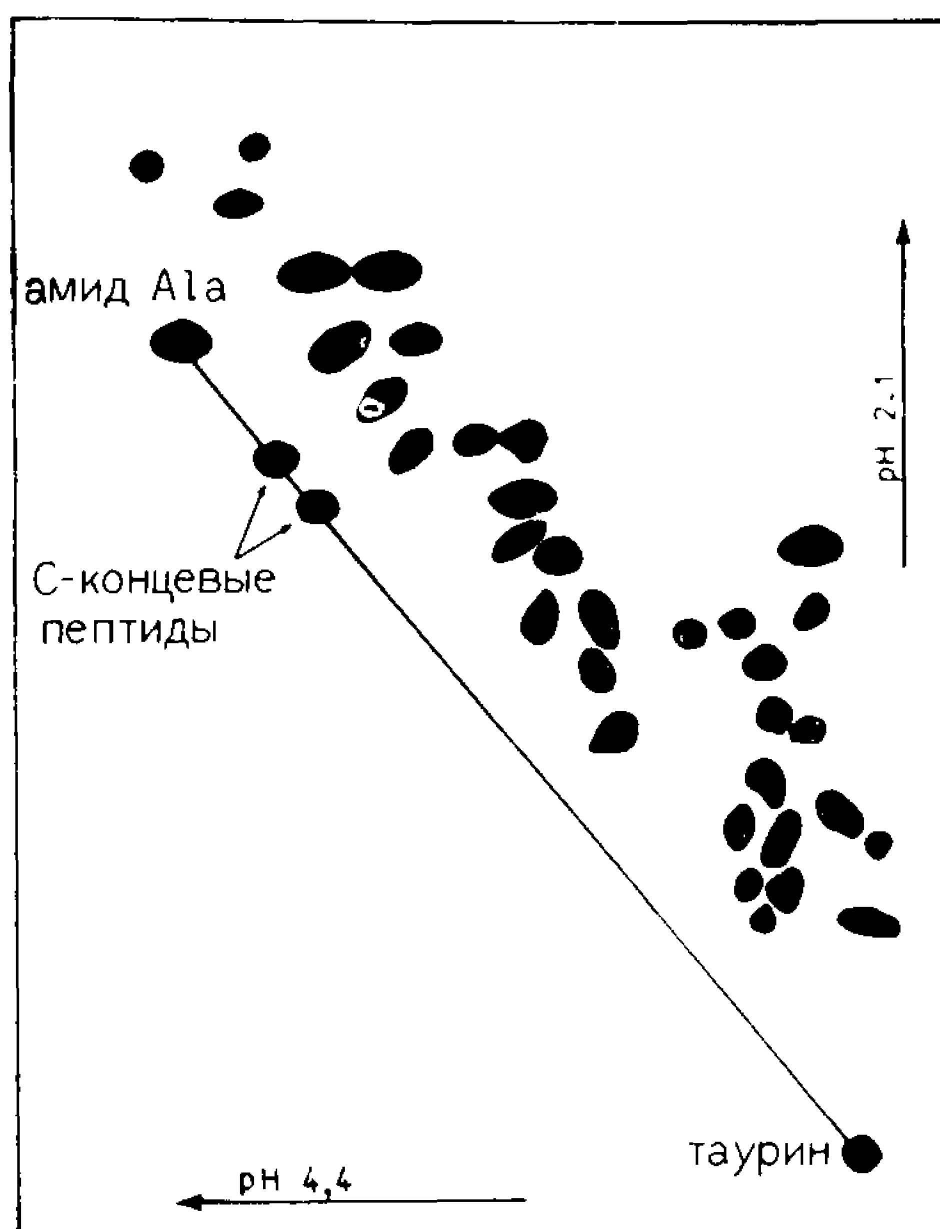


РИС. 18.2. Избирательное выделение С-концевых пептидов термолитического гидролизата α- и β-цепей гемоглобина человека. Гидролизат разделяли электрофорезом при pH 4,4 в первом направлении и при pH 2,1 — во втором [21].

выделенного пептида можно проводить с помощью известных (стандартных) методов.

Наличие этаноламина на карбоксильном конце выделенного пептида гарантирует принадлежность этого пептида карбоксильному концу белка. Возможные невысокие выходы присоединения этаноламина к белку не являются серьезным ограничением метода, так как любой неамидированный пептид после ЭФ оказывается смещенным с диагонали и поэтому не мешает определению искомого фрагмента. Наконец, метод должен оказаться применимым к белкам, имеющим природную амидированную С-концевую аминокислоту, так как подобные белки содержат блокирующую группу того же типа, что и при искусственном амидировании.

18.3. Определение С-концевых групп

С-концевые аминокислоты пептидов или белков можно определить при помощи химических или ферментативных методов. Химические методы включают гидразинолиз, селективное введение трития, избирательное восстановление, образование альдегидов, алкоголиз оксазолов в кислой среде, тиоцианатное или цианамидное расщепление. При ферментативном определении используют карбоксипептидазы. Этот подход в последние годы

получил более широкое применение благодаря увеличению числа коммерчески доступных ферментов микробного или растительного происхождения, которые к тому же имеют более широкую специфичность, чем ферменты поджелудочной железы. Расщепление под действием карбоксипептидазы, а также химическими методами обычно дает информацию о С-концевом остатке и С-концевой последовательности аминокислот. Новичкам настоятельно рекомендуется использовать ферментативные методы, если доступна высокочувствительная система детекции. Описана методика ВЭЖХ производных аминокислот с предколоночной модификацией аминокислот при помощи *о*-фталевого диальдегида (ОФА), что позволяет проводить высокочувствительный количественный С-концевой анализ [42].

18.3.1. Селективное введение трития

Среди химических методов определения С-концевых аминокислот к простейшим относится селективное введение трития. Этот метод обладает высокой чувствительностью, проводится с использованием легко доступных реагентов, при очень мягких условиях. После введения тритиевой метки избыточные атомы ^3T удаляются путем повторения чередующихся операций добавления — упаривания воды. Затем проводят гидролиз 6 М соляной кислотой (метансульфоновой кислотой, если предполагается определение Trp [78]); далее аминокислоты разделяют обычными методами пептидного картирования и определяют радиоактивность в жидкостном сцинтилляционном счетчике. Первоначально этот метод был качественным [57], однако в настоящее время возможно количественное определение трития.

Селективное введение трития включает три последовательные реакции (рис. 18.3). В основе методики лежит различие в химической активности карбоксилов С-концевой аминокислоты и боковых цепей. С-Концевой карбоксил уникален, так как его можно активировать путем образования оксазолинона (внутримолекулярное взаимодействие с соседней по цепи пептидной связью, происходящее с выделением воды) [69]. Эта реакция проходит при участии уксусного ангидрида. Образующийся при этом оксазолинон содержит активный атом водорода, который легко замещается на тритий при обработке ^3H_2O в присутствии пиридина. Оксазолинон претерпевает катализируемую основанием рацемизацию, сопровождаемую гидролитическим раскрытием кольца и регенерацией С-концевой аминокислоты, содержащей атом трития при α-углероде.

Установлено, что водородно-тритиевый обмен происходит при асимметрическом атоме углерода аминокислоты в условиях рацемизации [58]. Поскольку из пептидного синтеза извест-

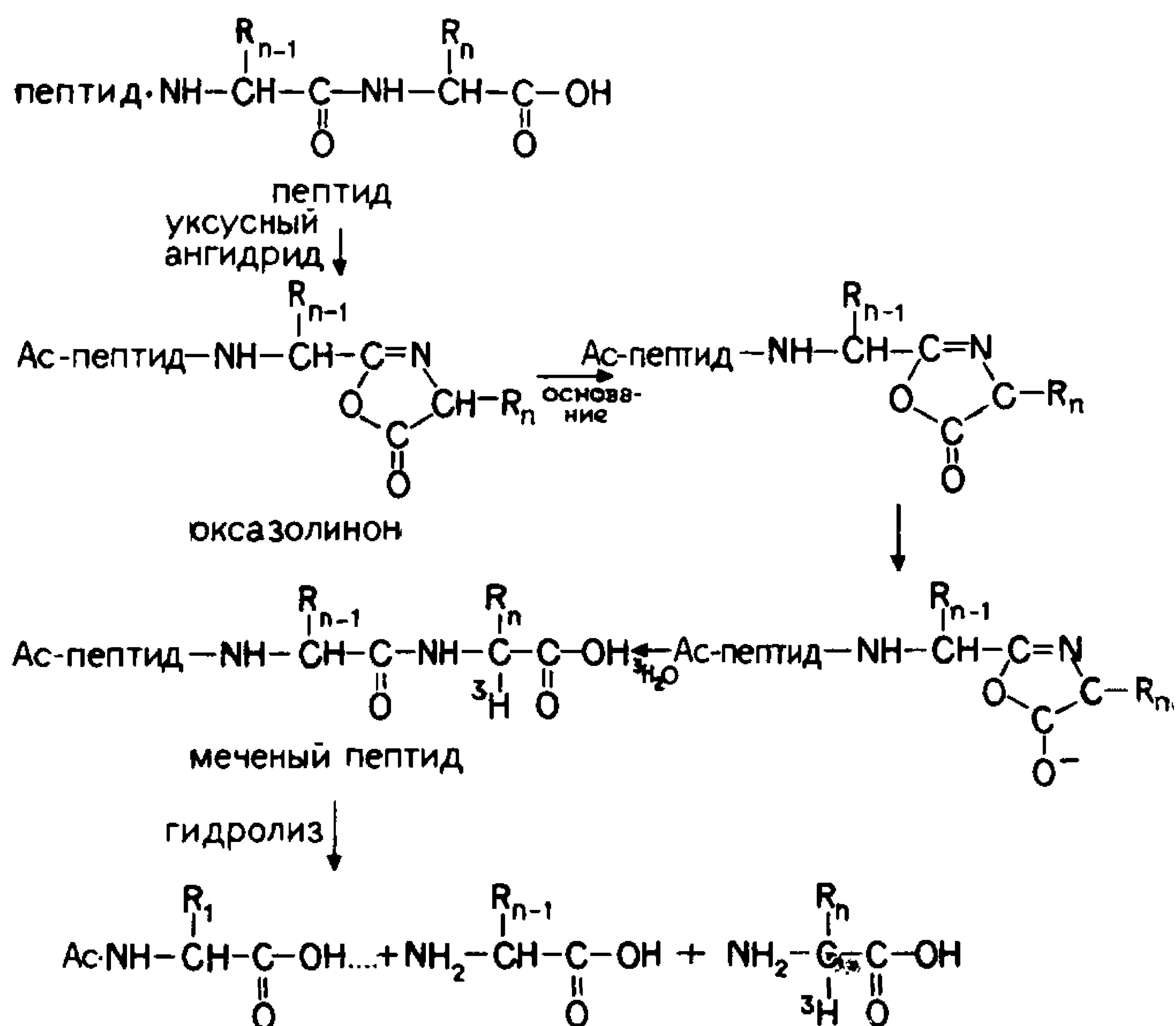


РИС. 18.3. Избирательное введение трития в С-концевую аминокислоту [57].

но, что процесс рацемизации, происходящий в ходе синтеза, протекает через стадию образования промежуточного оксазолинона С-концевой аминокислоты, то предполагается, что получение таких оксазолинонов химическим путем может оказаться высокоспецифическим методом введения дейтерия (трития) в С-концевые аминокислоты полипептидов [58].

Исследовались три варианта избирательного мечения тритием. Исходная методика [59] включает две стадии: образование оксазолинона при нагревании пептида с карбодиимидом (дициклогексилкарбодиимидом, ДЦК) или уксусным ангидридом в безводном диоксане с последующим добавлением одной капли пиридина и 0,5 мл D_2O для проведения катализируемой основанием рацемизации с гидролитическим раскрытием кольца. Было найдено, что в указанных условиях аминокислоты подвергались полному дейтерированию исключительно по α-углеродному атому.

Контроль дейтериевого обмена осуществляется с помощью ЯМР-спектроскопии; замена D_2O на ^3H_2O привела к разработке простого и чувствительного метода определения С-концевой аминокислоты.

Вторая методика была разработана для селективного введения трития в С-концевые остатки Pro и Asp [60]. В вышеуказанных условиях эти аминокислоты не образуют оксазолиноны, но дают либо смешанный ангидрид (Pro), либо циклический ангидрид (Asp). При обработке пиридином и ^2H_2O эти ангидриды не включают метку, но их можно метить дейтерированной уксусной кислотой. Методика включения метки в Pro и Asp при помощи кислотного катализа была упрощена до одностадийной и заключалась в обработке пептида смесью уксусного ангидрида и ^3H_2O.

Третий вариант был разработан для белков. Поскольку большинство белков нерастворимо в безводном диоксане, используемом при мечении пептидов, этот растворитель был заменен на смесь водного пиридина, ^3H_2O и уксусного ангидрида. В такой системе три реакции проходят в одну стадию (рис. 18.3). Предполагается, что включение метки происходит с образованием промежуточного оксазолинона, находящегося в равновесии с исходным С-концевым пептидом.

При проверке всех трех методик выяснилось, что одностадийная методика с использованием основного катализа, разработанная для белков, дает наилучшие результаты и в случае пептидов [36]. Кроме того, было найдено, что в противоположность исходному двухстадийному варианту с использованием безводных растворителей одностадийный метод позволяет заменять водород на тритий в С-концевом остатке Asp (возможно, из-за того, что Asp не может образовывать циклический ангидрид в водной среде). Подробная методика приведена ниже.

18.3.1.1. Введение трития [60]. Образец (3—20 нмоль), помещенный в маленькую пробирку (13×100 мм), растворяют в 0,05 мл ^3H_2O (50 мКи). Добавляют пиридин (0,1 мл) и уксусный ангидрид (0,025 мл), раствор оставляют при комнатной температуре на 3 ч. Растворители удаляют в вакууме при 40 °С. Легко обменивающийся тритий удаляют путем многократных операций добавления — упаривания воды (6×100 мкл). Меченый образец гидролизуют в той же пробирке 6 М соляной кислотой, содержащей 0,004 М тиогликолевую кислоту (в вакууме, при 108 °С, в течение 24 ч).

Для идентификации меченой С-концевой аминокислоты можно использовать любой вид хроматографии: бумажную, тонкослойную, газожидкостную, ионообменную, ВЭЖХ. Удобно использовать метод двумерного картирования на бумаге ватман 3 ММ, так как при этом можно одновременно анализировать несколько образцов. Сухой гидролизат растворяют в 50 мкл воды, добавляют 2 мкл смеси стандартных аминокислот (~5 нмоль каждой аминокислоты). Проводят высоковольтный электрофорез при pH 1,8 (3000 В, 45 мин). Часть хроматограммы (полоску шириной ~100 мм), содержащую частично разделенные аминокислоты, пришивают ко второму листу бумаги (200×200 мм) и проводят восходящую хроматографию (~3,5 ч) в системе *н*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин (15 : 3 : 12 : 10). После проявления нингидрин-коллидиновым реагентом (разд. 8.14.2) вырезают пятна аминокислот и определяют на жидкостном сцинтиляционном счетчике их ра-

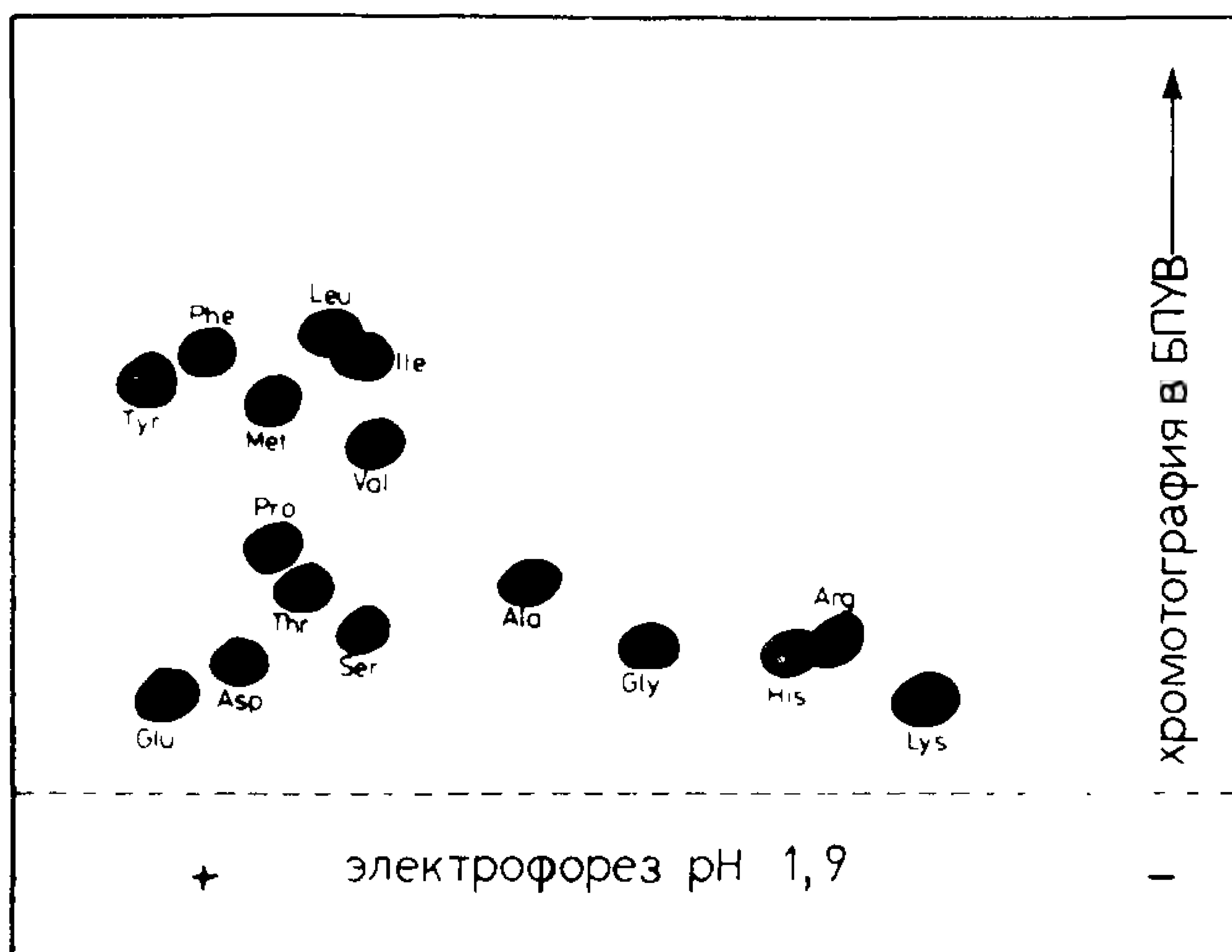


РИС. 18.4. Двумерное разделение хроматографией на бумаге смеси аминокислот после избирательного введения трития и гидролиза пептида. Гидролизат и смесь стандартных аминокислот разделяли электрофорезом при pH 1,9 в первом направлении и хроматографией — во втором направлении в системе *н*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин (15 : 3 : 12 : 10).

диоактивность. На рис. 18.4 и в табл. 18.1 приведены результаты, полученные при использовании этой методики для определения С-концевых аминокислот нескольких химотриптических пептидов легкой цепи гемагглютинина вируса гриппа. Ясно видны соответствующие аминокислоты пептидов С4А, С5, С6. Радиоактивность включенного в С-концевые аминокислоты трития существенно превышает уровень фона. На рис. 18.4 видно, что разделяются все аминокислоты, кроме Leu/Ile, которые частично перекрываются. Тем не менее и в этом случае возможна идентификация, так как радиоактивность отчетливо распределяется по двум пятнам, как это видно в случае пептида С3 (табл. 18.1). Благодаря применению различных систем растворителей, по-видимому, можно улучшить разделение [36]. Следует отметить, что во внутренние остатки Glu метка почти не включается, а во внутренние Asp включается в разной степени. Сообщалось, что остатки Asp, входящие в последовательность Asp-Gly (пептид С3, табл. 18.1), содержат значительно больше трития, чем другие внутренние остатки Asp (см. пептид С6, табл. 18.1) [4].

При использовании системы пиридин — ^3H_2O — уксусный ангидрид (4 : 2 : 1) в условиях, изложенных ранее, протекает быстрый катализируемый основанием гидролиз уксусного ангидрида, что приводит к разрушению ангидрида до завершения образования оксазолинона и к снижению выхода реакции. Использование большого избытка уксусного ангидрида не улучшает результаты, так как значительно возрастает температура реакции, что влияет на растворимость белка и происходят нежелательные побочные реакции [14, 38]. При использовании смеси пиридин — ^3H_2O — уксусный ангидрид (3 : 1 : 3) на холоду включение трития в С-концевой остаток Leu лизоцима яичного белка увеличилось в ~20 раз [57].

18.3.1.2. Включение трития в белки [57]. Белок (50—100 нмоль) помещают в небольшую пробирку, добавляют 5 мкл (0,5 мКи) ^3H_2O и 10 мкл пиридина. Раствор должен быть прозрачным, в противном случае включенне метки

Таблица 18.1. Избирательное введение трития в некоторые пептиды химотриптического гидролизата легкой цепи гемагглютинина вируса гриппа[a]

Аминокислота	Радиоактивность (имп./мин)			
	C_3	C_4	C_5	C_6
Lys	218	83	35	72
His	50	26	55	91
Arg	50	24	44	146
Asp	1860	170	58	248
Thr	33	32	22	26
Ser	37	31	30	48
Glu	121	45	41	126
Pro	38	12	5	23
Gly	45	34	36	63
Ala	39	20	22	29
Met	68	117	47	23
Ile	425	56	50	50
Leu	1782	99	85	47
Tyr	53	73	120	4523
Phe	63	2451	3221	68
нмоль пептида	7	4	6	11

[a] 4—11 нмоль пептидов метили и гидролизовали, как описано в разд. 18.3.1.1. Аминокислоты разделяли, как указано в подписи к рис. 18.4. Пептиды имели следующую структуру [92]:
C_3 — Lys-Ser-Thr-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Gln-Asp-Gly-Lys-Leu
C_4 — Asn-Arg-Val-Ile-Glu-Lys-Thr-Asn-Glu-Lys-Phe
C_5 — His-Gln-Ile-Glu-Lys-Glu-Phe
C_6 — Ser-Glu-Val-Glu-Gly-Arg-Ile-Gln-Asp-Leu-Glu-Lys-Tyr.

будет неудовлетворительным. Если суммарный объем раствора окажется больше расчетного, то объемы всех реагентов также следует увеличить так, чтобы сохранить необходимые соотношения. Добавляют при 0 °С уксусный ангидрид (10 мкл), закрывают пробирку пленкой парафильм и выдерживают при 0 °С в течение 5 мин, затем при 20 °С еще 15 мин. Проводят при 0 °С второе добавление пиридина (20 мл) и уксусного ангидрида (20 мкл). Реакционную смесь оставляют при 0 °С в течение 5 мин, затем при 20 °С еще 1 ч. Избыток уксусного ангидрида разрушают добавлением меченой воды (5 мкл), реакционную массу оставляют при 20 °С на 1 ч. Раствор упаривают досуха, легко обменивающийся тритий удаляют путем повторения чередующихся операций добавления — упаривания (по 100 мкл) 10%-ной уксусной кислоты. Меченый белок гидролизуют 6 М соляной кислотой, идентифицируют аминокислоты и измеряют радиоактивность.

Эта методика включения была использована для количественного определения С-концевых остатков [57]; обнаружено, что степень мечения сильно зависит от природы этой аминокислоты (табл. 18.2). Степень мечения меняется, но можно проводить количественное определение С-концевого остатка, введя поправку, учитывающую отношение включения трития в искомую и в стандартную С-концевые аминокислоты, определяемого и стандартного белков (табл. 18.2). Существуют и неразрешенные еще проблемы; так, не обнаруживается Pro, а определение Ser и Thr приводит к невоспроизводимым результатам; при наличии Gly в предпоследнем положении может снижаться содержание метки в С-концевой аминокислоте.

Таблица 18.2. Сравнительные коэффициенты включения трития в различные ацетиламинокислоты (относительно меченого ацетилаланина)[a]

Аминокислота	Коэффициенты	Аминокислота	Коэффициенты
Lys	1,52	Gly	0,68
His	0,61	Ala	1,00
Arg	1,96	Val	0,93
Asp	0,32	Met	2,32
Asn	2,30	Ile	1,18
Thr	0,09	Leu	2,27
Gln	0,82	Tyr	1,95
Glu	1,16	Phe	2,01

[a] Навеску каждой N-ацетиламинокислоты метили тритием в присутствии известного количества N-ацетилаланина. После кислотного гидролиза и разделения аминокислот измеряли отношение удельной радиоактивности изучаемой С-концевой аминокислоты и внутреннего стандарта (Ala). Радиоактивность Ala принята за 1,00 [57].

18.3.2. Гидразинолиз

Гидразинолиз впервые был использован в 1952 г. для определения С-концевых аминокислот; однако на практике этот простой метод часто приводит к неудовлетворительным результатам даже при введении большого числа поправок [1, 2, 11—13, 45, 46, 62, 65, 66].

При нагревании белка (пептида) с гидразином пептидные связи разрываются, карбонильная группа пептидной связи образует гидразид. В виде свободной кислоты остается только С-концевая (рис. 18.5). Эту аминокислоту отделяют от всех гидразидов и идентифицируют.

Исходную методику неоднократно модифицировали путем изменения условий проведения реакции, метода отделения гидразидов от свободной кислоты или метода определения и количественного анализа С-концевой аминокислоты.

Первоначально методика включала нагревание белка с гидразином при 100 °С в течение 10 ч [1]. При этих условиях цистин и цистеин (но не цистеиновая кислота, 5-карбоксиметилцистеин или S-аминоэтилцистеин) полностью разрушаются [11]; Arg разрушается и частично превращается в Orn и гуанидин [65]. Многие другие остатки частично разрушаются из-за высокой температуры реакции [11, 12]. Сообщалось, что добавление кислого катализатора (сульфат гидразина) к безводному гидразину позволяет проводить реакцию в гораздо более мягких условиях (60—80 °С) [46]; при этом повышается выход С-концевых аминокислот. Для улучшения выхода использовали H^+-форму ионообменной смолы амберлит CG-50 [12]. Показано, что скорости отщепления различных С-концевых аминокислот, а так-

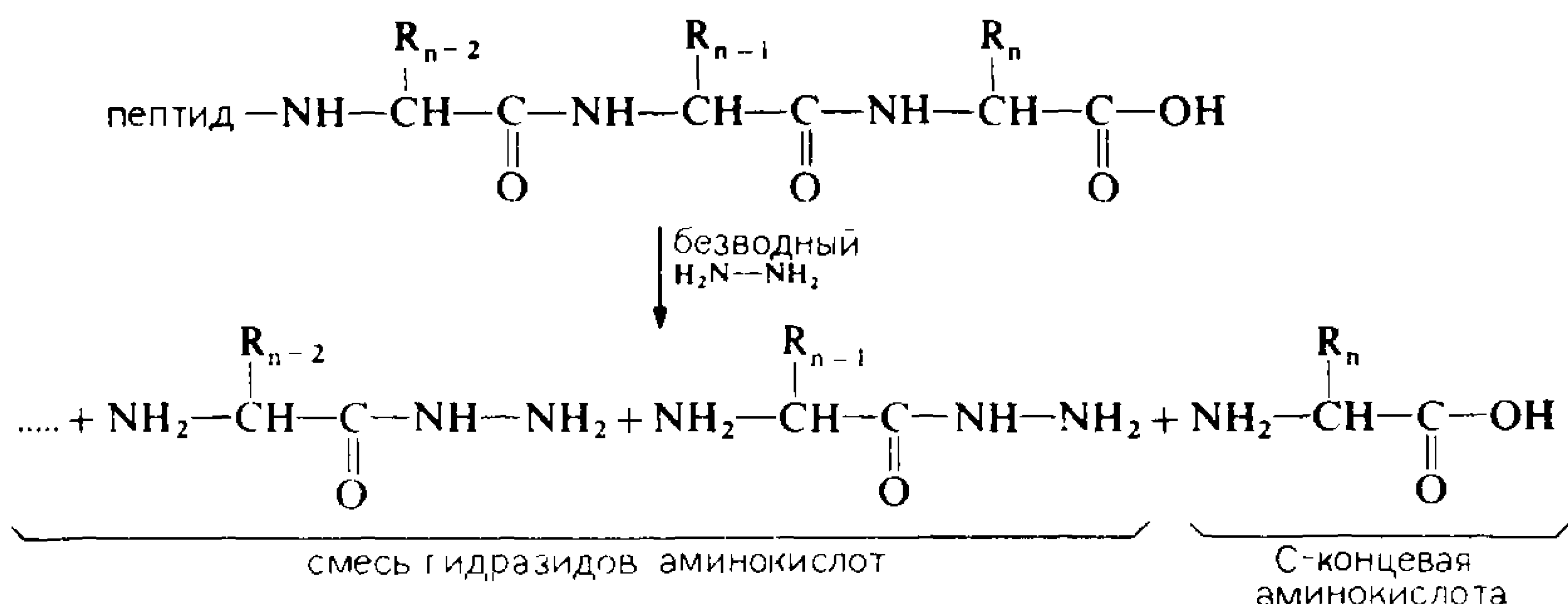


РИС. 18.5. Гидразинолиз пептида с освобождением С-концевой аминокислоты.

же устойчивость аминокислот в условиях гидразинолиза неодинаковы. Поэтому невозможно дать каких-либо рекомендаций, касающихся продолжительности проведения реакции, что обычно очень желательно. Поэтому следует провести серию опытов, изменяя время нагревания.

Отделение свободных С-концевых аминокислот от смеси гидразидов аминокислот следует проводить быстро, так как гидразиды малоустойчивы и в присутствии воды легко превращаются в свободные аминокислоты. Чувствительность определения зависит от метода разделения и чувствительности детектора. В первоначальном варианте к водному раствору гидразидов аминокислот добавляли свежеперегнанный бензальдегид, который превращал гидразиды аминокислот в маслянистые дибензали, легко отделяемые от свободных аминокислот путем центрифугирования [1]. Однако при однократной обработке бензальдегидом гидразиды аминокислот отделялись не полностью. Изменение методики и использование изоамилового альдегида [2], энантового (гептилового) альдегида [9], а также *n*-нитробензальдегида [66] не дали заметного улучшения. Гидразинолизат обрабатывали 2,4-динитрофторобензолом (ДНФ), что привело к образованию нейтральных ди- и три-ДНФ-производных, которые легко отделяются от кислой моно-ДНФ-С-концевой аминокислоты путем экстракции этилацетатом и диэтиловым эфиром [46]. Кислые ДНФ-производные идентифицировали методом двумерной бумажной хроматографии [53]. Можно обрабатывать гидразиды сначала бензальдегидом, потом ДНФ-бензолом, а затем уже проводить экстракцию [65]. С-Концевую ДНФ-аминокислоту определяли методом бумажной хроматографии.

Как указывалось в одной из работ [7], многие из этих сложных модификаций были предложены до появления современных методов аминокислотного анализа и в настоящее время устарели. Хотя гидразинолизат после удаления избытка гидразина

можно нанести прямо на колонку аминокислотного анализатора, этого не рекомендуется делать, так как гидразиды очень трудно удалить с колонки и для регенерации смолы может потребоваться до пяти объемов обычных промывок едким натром. Предпочтительнее отделить гидразиды от свободной С-концевой аминокислоты, пропустив раствор через колонку с катионитом, например фосфоцеллюлозой или амберлитом IR-120, как описано ниже.

18.3.2.1. Методика гидразинолиза [12].

Получение безводного гидразина. Гидразин перегоняют над гидроксидом натрия под азотом в обычном стеклянном перегонном аппарате. В 250 мл круглодонную колбу помещают 100 мл «безводного» (продажного) гидразина (95%-ный) и 40 г гидроксида натрия, продувают прибор сухим азотом, пропущенным через концентрированную серную кислоту. Гидразин нагревают под азотом при атмосферном давлении до температуры кипения, затем охлаждают до комнатной температуры. Гидразин перегоняют в вакууме (масляный насос), в потоке азота, подаваемого через капилляр, собирая фракцию, кипящую при 16—18 °С в 100-миллиметровую круглодонную колбу-приемник, охлаждаемую сухим льдом. Перегнанный гидразин хранят в закрытой колбе над пентоксидом фосфора при 2 °С или лучше в запаянных ампулах (порциями по 5 мл). Гидразин быстро поглощает влагу воздуха и становится непригодным для проведения гидразинолиза.

Реакция гидразинолиза. Смолу (амберлит CG-50, <200 меш) промывают последовательно 1 М едким натром, водой, 2 М соляной кислотой, затем вновь водой до отрицательной реакции на хлорид-ионы. Смолу сушат в печи при 80 °С и хранят в вакуум-эксикаторе над пентоксидом фосфора.

Сухой амберлит CG-50 (50 мг) помещают в толстостенную пробирку из пирекса (15×125 мм). Добавляют лиофилизированный белок ($\sim$250 нмоль), на уровне верхней трети высоты пробирки делают перетяжку и вносят гидразин (2 мл), который втягивается внутрь пробирки через узкую перетяжку после охлаждения нижней части пробирки в спирте с сухим льдом. Важно исключить поглощение углекислого газа воздуха гидразином, так как это ведет к появлению большого количества нингидрин-положительного материала, который мешает при последующей хроматографии. Замороженный образец запаивают в вакууме, помещают в термостат при 80 °С на 10—100 ч. Во время гидразинолиза надо мягко встряхивать образец (3—4 раза в день). Если по каким-то причинам образец нельзя анализировать сразу после проведения гидразинолиза, раствор можно хранить, не вскрывая ампулы, при —20 °С.

После гидразинолиза реакционную смесь переносят в сухую круглодонную колбу на 25 мл, принимая меры для предотвращения попадания влаги воздуха. При возможности работу следует проводить в сухой камере. Пробирку ополаскивают гидразином (2 раза по 1 мл) и объединенный раствор лиофилизируют; через 3 ч гидразин полностью удаляется из замороженной смеси.

Хроматографическое отделение гидразидов от отщепленной С-концевой аминокислоты. В оригинальной методике [12] для хроматографического отделения свободной С-концевой аминокислоты от гидразидов аминокислот использовали три катионообменные смолы (амберлит IR-120, амберлит CG-50 и фосфоцеллюлозу). Для хроматографии на амберлите IR-120 необходимы два летучих буфера (pH 3,1 и 5,2) и колонка, термостатированная при 30 °С; время анализа составляет $\sim$8 ч. Хроматография на фосфоцеллюлозе экспериментально проще, требует только 4 ч, происходит в одном буфере при комнатной температуре; при этом удается за один рабочий цикл отделить все аминокислоты, а также моногидразиды Asp и Glu. Однако фос-

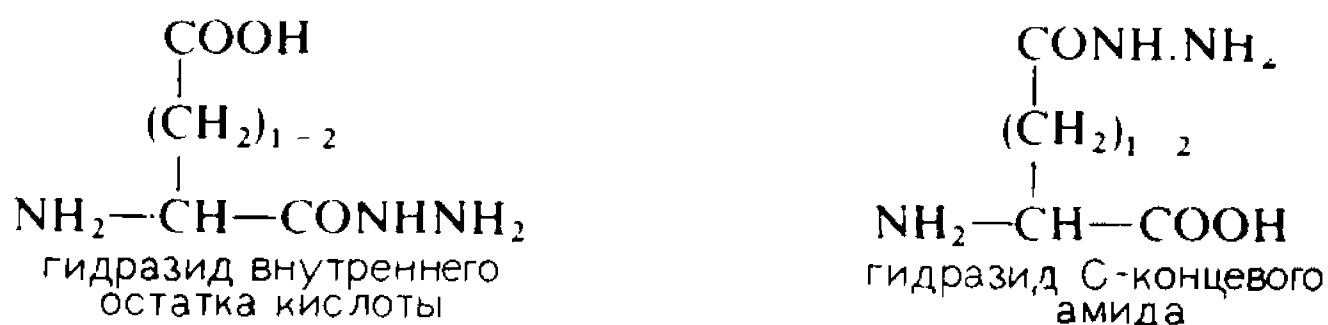


РИС. 18.6. Структура гидразидов внутренних остатков Asp и Glu и С-концевых Asn и Gln.

фоцеллюлоза имеет меньшую емкость и на колонку размером 10×300 мм нельзя загружать >10 мг белка. Применение амберлита CG-50 не дает никаких преимуществ. Фракционирование с применением фосфоцеллюлозы описано ниже.

Непосредственно перед разделением лиофилизат, содержащий гидразиды, свободные аминокислоты и смолу-катализатор, суспендируют в 3,0 мл воды, центрифугируют, смолу дважды промывают 1 мл воды. Маточный раствор и промывки (pH 8,5—9,0) объединяют; добавляют несколько капель 2 М соляной кислоты до pH 2. Наносят раствор на колонку с фосфоцеллюлозой (10×300 мм, фирма Whatman, марка P-70, нефракционированная), уравновешивают 0,4 М пиридин-формиатным буфером (pH 3,2; 32,2 мл пиридина +47 мл 98%-ной муравьиной кислоты, доводят объем водой до 1 л), хроматографируют при комнатной температуре в буфере pH 3,2 при скорости потока 30 мл/ч. Собирают фракции по 2 мл, проверяют их нингидрином на наличие аминокислот. Кислые и нейтральные аминокислоты элюируются в объеме между 20 и 37 мл элюата, Lys, аммиак, моногидразиды Asp и Glu — между 42 и 75 мл, His — между 80 и 90 мл, Arg — между 93 и 112 мл. Гидразиды аминокислот прочно удерживаются на колонке, поэтому ее используют лишь один раз. Соответствующие фракции объединяют, сушат и анализируют. Перед определением Asp и Glu следует гидролизовать их моногидразиды.

Заключительный комментарий. Из-за различия как в скорости отщепления, так и в устойчивости С-концевых аминокислот невозможно дать конкретные рекомендации относительно продолжительности проведения реакции гидразинолиза. Лучше всего анализировать серию образцов, нагревая их при 100 °С в течение 10—100 ч. Методика позволяет проводить количественное определение всех С-концевых аминокислот, за исключением Arg, Asn, Gln и, возможно, Lys. При гидразинолизе С-концевые Asn и Gln выщепляются в виде моногидразидов (замещение по амидным группам боковых цепей). Эти моногидразиды по строению и хроматографическим свойствам очень похожи на моногидразиды, получающиеся из внутренних остатков Asp и Glu (рис. 18.6). Их определение затрудняется из-за того, что по некоторым сведениям оба моногидразида Asp могут взаимно превращаться друг в друга [62].

18.3.3. Селективное восстановление

Химическое восстановление С-концевой аминокислоты в соответствующий спирт было первой химической реакцией, использованной для определения С-концевой аминокислоты белков. Например, инсулин нагревали с $LiAlH_4$ в N-этилморфолине при 55 °С в течение 8 ч и определяли полученные аминоспирты методом хроматографии на бумаге [26]. Реакцию восстановления

проводили также после предварительной этерификации всех карбоксильных групп белка [17]. При этом использовали мягкий восстанавливающий агент $LiBH_4$ в тетрагидрофуране, затем количественно определяли аминоспирты, полученные из С-концевых аминокислот. Наряду с основными процессами происходит восстановительное расщепление пептидных связей (1—2%) и перевод пептидных карбонилов в метиленовые группы.

Для восстановления С-концевых аминокислот ди- и трипептидов использовали коммерчески доступный дигидробис(2-метоксиэтокси)алюминат натрия [75]. Метод позволяет исключить предварительную этерификацию карбоксильных групп. Аминоспирты идентифицировали бумажной хроматографией. До сих пор неизвестно о применении этого способа восстановления для определения С-концевых аминокислот белков. Сообщалось, что $NaBH_4$ в водном растворе (но не в органическом растворителе) селективно и почти количественно восстанавливает этерифицированные С-концевые аминокислоты в соответствующие спирты [32]. При работе с лизоцимом, инсулином быка, конканавалином А были получены ожидаемые производные, при этом не было обнаружено побочных процессов. Этот подход может быть доведен до практической методики С-концевого анализа белков, хотя дальнейшее развитие событий во многом зависит от степени надежности аналитического определения аминоспиртов, получающихся из всех обычных аминокислот.

18.3.4. Определение С-концевых аминокислот в виде альдегидов

О-Пивалоилгидроксиламин количественно реагирует с активированными карбодиимидом карбоксилсодержащими кислотами, образуя О-пивалоилпептидогидроксаматы (рис. 18.7) [61]. Ионизация гидроксаматной связи N-H (рK_a 6,7—7,4) инициирует в пептидах перегруппировку Лоссеня, приводящую к образованию пептидилизоцианата, который в свою очередь превращается в смесь пептидилмочевин. Из раствора отбирают аликвоту, гидролизуют 6 М соляной кислотой, определяют С-концевую аминокислоту дифференциальным методом; при этом С-концевая аминокислота превращается в альдегид. Альдéгид можно получить и другим путем: доводят рН до 1—2 и нагревают реакционную смесь в течение 2 ч при 50 °С.

Эту методику успешно применяли для определения С-концевых аминокислот восемнадцати ди-, три-, тетра- и пентапептидов, а также А- и В-цепей инсулина. При этом С-концевую аминокислоту определяли дифференциальным методом, хотя в некоторых случаях альдегид количественно определяли методом хроматографии на бумаге в виде 2,4-динитрофенилгидразона.

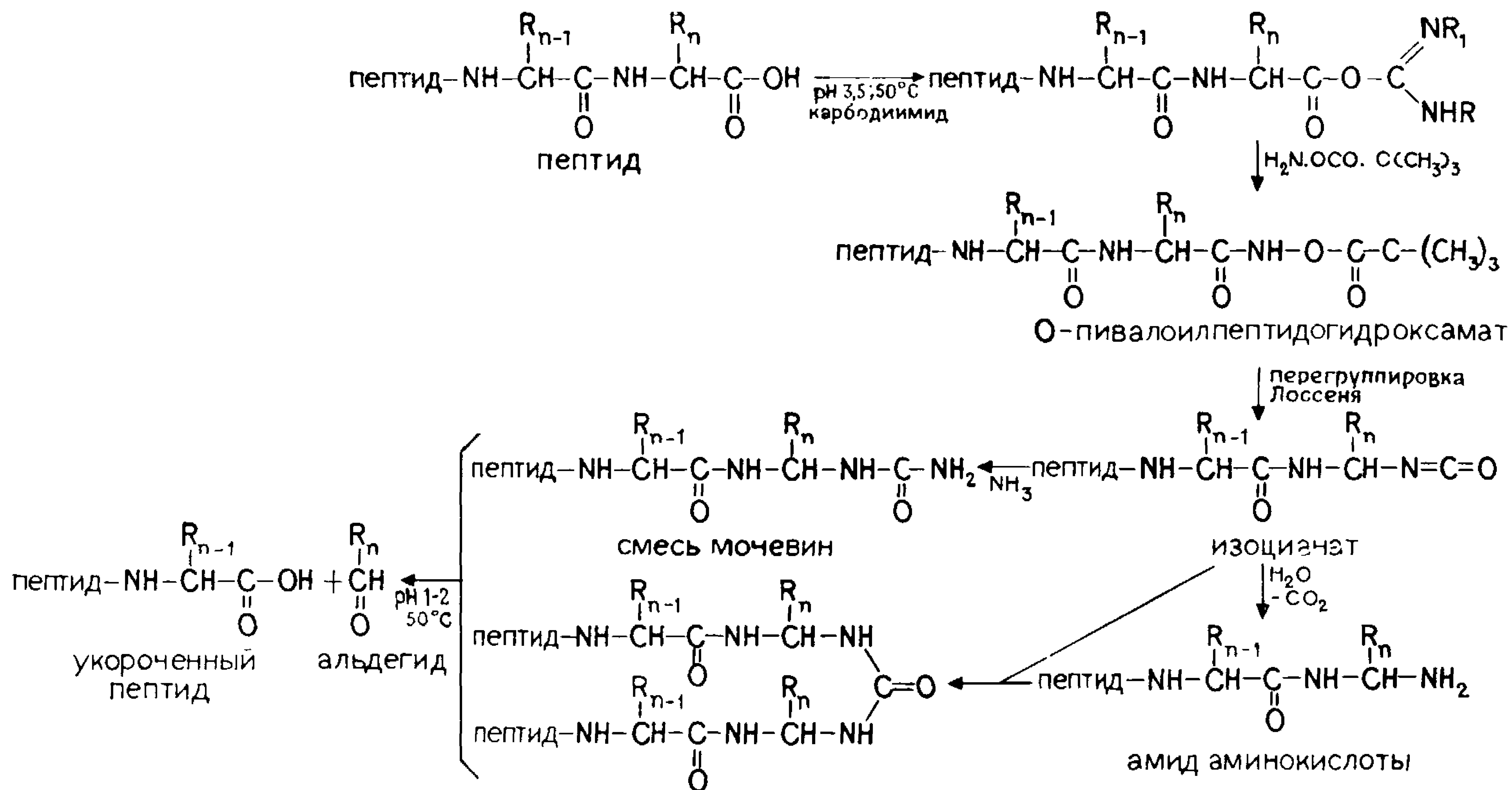


РИС. 18.7. Реакции, происходящие при С-концевом анализе с образованием альдегида. О-Пивалоилгидроксиламин количественно реагирует с С-концевой аминокислотой, активированной карбодиимидом, образуя гидроксамат. Ионизация связи N—H гидроксамата инициирует перегруппировку Лоссеня с последующим превращением С-концевой аминокислоты в альдегид [61].

К достоинствам описанного метода можно отнести возможность использования водных растворов (и при необходимости мочевины), высокие выходы (для большинства аминокислот 70—100%) и успешное определение С-концевых Pro, Asn и, возможно, Gln. Однако для Asp и Glu наблюдаются низкие выходы (может быть, из-за образования циклических ангидридов при активации карбодиимидом), что приводит к повторному образованию исходных аминокислот при гидролизе. Кроме того, до настоящего времени метод применялся по отношению к небольшим пептидам, для которых только и имеет смысл проводить дифференциальный аминокислотный анализ.

18.3.4.1. О-Пивалоилгидроксиламин [61]. Гидрохлорид О-пивалоилгидроксиламина (ОПГА-HCl, 154 мг, 1 ммоль) растворяют в 4 мл воды, доводят pH до 3,5 при помощи 1 М едкого натра. Добавляют раствор пептида (1 мкмоль) в 2,0 мл воды с последующим немедленным внесением 0,4 мл 0,5 М водного раствора ЭДК; поддерживают (pH-стат) pH 3,5 путем добавления 0,1 М соляной кислоты. С интервалами 15 мин добавляют порциями раствор ЭДК (3 раза по 0,4 мл). Избыток ЭДК и ОПГА-HCl «гасят» 0,5 мл 5 М формиатного буфера (pH 3,5) при перемешивании в течение 20 мин. Перегруппировка Лоссеня начинается при увеличении pH до 8,5 и температуре 50 °С. pH 8,5 поддерживается в течение 20 ч при помощи 1 М NaOH. Процесс контролируют по расходу щелочи для поддержания pH (pH-стат). Пробу (аликвоту) гидролизуют 6 М HCl и проводят аминокислотный анализ; С-концевой статок определяют дифференциальным методом.

18.3.5. Определение С-концевых аминокислот путем алкоголиза оксазолов

В основе этого нового метода С-концевого анализа лежит превращение С-концевой аминокислоты в имидоэфир, который в кислых условиях легко расщепляется спиртами [68]. Циклические имидоэфиры образуются в ходе внутримолекулярной дегидратации, происходящей при образовании либо оксазолинона (замыканием С- концевой карбоксильной группы на последнюю пептидную связь), либо оксазола (замыкание сложноэфирной С-концевой группы на последнюю пептидную связь).

Для успешного проведения реакции путь с образованием оксазола является предпочтительным, так как последний в условиях кислотного алкоголиза количественно расщепляется, давая сложный эфир С-концевой аминокислоты. Расщепление оксазолинонов спиртами в кислых условиях дает свободную С-концевую аминокислоту, но главным побочным продуктом является нерасщепленный сложный эфир пептида (рис. 18.8). Метод можно использовать для идентификации С-концевых остатков; в настоящее время предпринимаются попытки разработать на этой основе методику последовательного С-концевого анализа.

пептид
уксусный ангидрид
оксазолинон
$MeOH, H^+$
эфир пептида
ортоэфир укороченного пептида
С-концевая аминокислота
эфир пептида
PCl_5
оксазол
$MeOH, H^+$
ортоэфир укороченного пептида
эфир С-концевой аминокислоты

РИС. 18.8. Реакции, происходящие при С-концевом анализе с алкоголизом оксазолинона или оксазола. Катализируемый кислотой алкоголиз может проходить по двум направлениям, что приводит к образованию нерасщепляемого сложного эфира пептида и С-концевой аминокислоты. Катализируемый кислотой алкоголиз соответствующего оксазола не имеет этого недостатка и приводит к получению сложного эфира С-концевой аминокислоты [68].

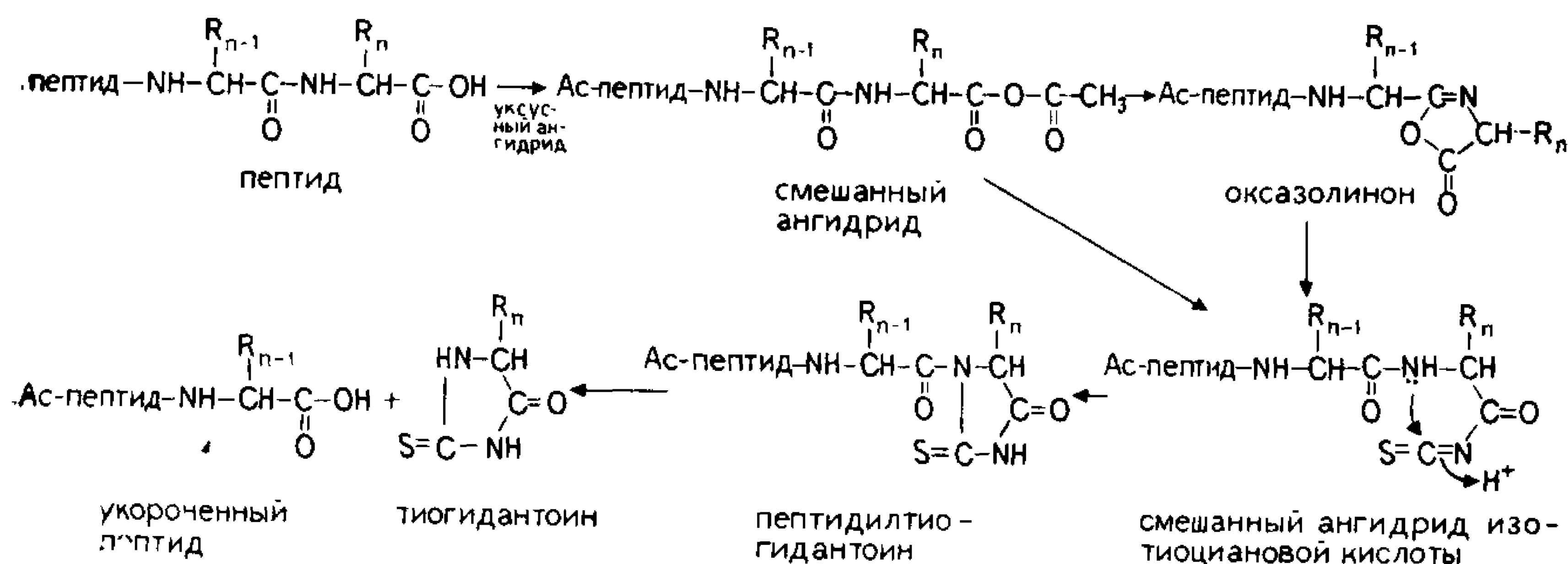


РИС. 18.9. Расщепление пептидов и белков при помощи тиоцианата [83].

18.4. Определение С-концевой последовательности

Пока не существует методов определения протяженных последовательностей С-концевых аминокислот. Применяемые химические и ферментативные подходы позволяют определить последовательность лишь нескольких остатков. В большинстве случаев для получения информации в основном используются карбоксипептидазы, несмотря на присущие этому методу недостатки: разные скорости отщепления различных аминокислот и трудности соблюдения тщательно контролируемых условий последовательного отщепления. Вопросы, связанные с использованием карбоксипептидаз, обсуждаются в разд. 18.4.4.

18.4.1. Расщепление при помощи тиоцианата

Среди всех химических подходов этот метод является наиболее исследованным [83]. Позднее он был модифицирован с целью улучшения условий проведения реакций в растворе [18, 48, 84, 97] и на твердой фазе [71, 94]. Однако каждый из предложенных вариантов позволял определять последовательность лишь нескольких С-концевых аминокислот.

Пептид (белок) выдерживают с тиоацетатом аммония в растворе уксусной кислоты и уксусного ангидрида для образования пептидилизотиоцианата, который спонтанно перегруппировывается в пептидилтиогидантоин (рис. 18.9). Последний избирательно расщепляют кислотой или щелочью; при этом получаются тиогидантоин С-концевой аминокислоты и укороченный пептид (белок) с новым С-концевым остатком.

В основу этого метода определения С-концевой последовательности положены результаты работы [41] по превращению ациламинокислот в тиогидантоины при помощи тиоцианата аммония и уксусного ангидрида. Позднее [76] к этой реакции до-

бавилась стадия отщепления (1 М едкий натр, 3 ч, комнатная температура), что позволило перейти к повторяющемуся образованию и отщеплению тиогидантоинов аминокислот, т. е. к анализу С-концевой последовательности полипептидов. Последняя методика с ограниченным успехом применялась для определения концевых групп ряда пептидов и белков [29]. Пересмотр условий образования и отщепления тиогидантоинов привел к появлению методики определения аминокислотной последовательности пептидов в более мягких условиях [83]. По такой же схеме можно определять и С-концевую последовательность белков [18]. Однако при указанных условиях не отщепляются Asp и Pro (Asp образует циклический ангидрид, не реагирующий с тиоцианатом аммония); это ограничение можно обойти, модифицируя обе карбоксильные группы Asp карбодиимидом [35] и снимая ферментативно защитную группу с α-карбоксила [44]).

Другие модификации включают использование ТФУ и ацетилхлорида вместо уксусного ангидрида [48], для того чтобы реакция проходила главным образом через образование смешанного ангидрида, а не оксазолинона [98]. Кроме того, предполагалось использовать в реакции не тиоцианаты, а саму тиоциановую кислоту [48]. В этих условиях удалось провести успешное определение аминокислотной последовательности пептидов, в том числе имевших С-концевой Pro. Проведение реакции с добавлением трифтороуксусного ангидрида [96] позволило определить 14 аминокислот папаина и 10 аминокислот рибонуклеазы [97].

При проведении процесса в растворе для отделения избытка реагентов от пептидилтиогидантоина и тиогидантоина от укороченного пептида обычно используют хроматографию на сефадексе. Эти разделения и лиофилизация фракций с колонки отнимают много времени. Твердофазный анализ исключает многие из этих проблем, но неудачный выбор (или предварительный синтез) активированного носителя и сложности присоединения пептида к носителю резко снижают шансы на успех определения. Ниже приводится детальное описание методик.

18.4.1.1. Расщепление пептидов тиоцианатом. Образование пептидилтиогидантоинов.

Методика 1 [83]. Растворяют пептид в 0,5 мл 50%-ной уксусной кислоты. К раствору пептида при перемешивании медленно добавляют свежий раствор тиоцианата аммония (100 мг), уксусного ангидрида (4,0 мл) и ледяной уксусной кислоты (1,0 мл). Нагревают при 50 °С в течение 6 ч, добавляют при перемешивании еще 100 мг тиоцианата аммония, нагревают реакционную массу при 50 °С еще 18 ч. Затем добавляют воду (3,0 мл) оставляют раствор стоять в течение нескольких минут для гидролиза избытка уксусного ангидрида.

Методика 2 [87]. Пептид обрабатывают 1,0 мл ацетилирующей смеси: уксусная кислота — уксусный ангидрид — пиридин (2 · 10 : 1) при 50 °С в течение 30 мин, затем добавляют 1,0 мл раствора тиоцианата аммония

в уксусной кислоте (20 мг/мл), нагревают реакционную массу при 50 °С при интенсивном перемешивании в течение 30 мин.

Методика 3 [48]. Растворяют пептид в смеси ТФУ (10 мкл) и ацетилхлорида (200 мкл), инкубируют реакционную смесь при 30 °С в течение 15 мин. Добавляют раствор 3%-ной роданистоводородной кислоты в диоксане (200 мкл) и выдерживают реакционную смесь при 30 °С еще 60 мин. После образования пептидилтиогидантоина растворитель можно удалить в вакууме.

Выделение пептидилтиогидантоина.

Методика 1 [83]. Пептидилтиогидантоин отделяют от избытка реагентов обессоливанием на колонке с сефадексом G-25 (20×500 мм) в 50%-ной уксусной кислоте. Собирают фракции по 5 мл, детектируя пептидилтиогидантоин по УФ-поглощению; нужные фракции объединяют.

Методика 2 [87]. Выделение проводят без хроматографического разделения. Отщепление проводят прямо в реакционной смеси после упаривания ее досуха.

Расщепление пептидилтиогидантоинов.

Методика 1 [83]. Объединяют фракции, содержащие пептидилтиогидантоин; растворитель упаривают в вакууме. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл 0,1 М ацетогидроксамовой кислоты в 50%-ном пиридине. Нагревают раствор при 50 °С в течение 2 ч, упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 3 мл 50%-ной уксусной кислоты, отщепленный тиогидантоин С-концевой аминокислоты отделяют от укороченного пептида хроматографией на колонке с сефадексом G-25 (20×500 мм).

Методика 2 [87]. Раствор без разделения упаривают досуха. Остаток растворяют в воде (3 мл), отщепляют тиогидантоин, для чего в реакционную смесь добавляют 2 г катионита (дауэкс 50 WX8) и перемешивают при 50 °С в течение 30 мин.

Методика 3 [48]. Отщепляют тиогидантоин 0,5 М триэтиламином.

18.4.1.2. Расщепление белков при помощи тиоцианата. Поскольку белки плохо растворимы в смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид, было предложено использовать тригидрат гексафтороацетона [18] и трифтороуксусный ангидрид [96].

Образование тиогидантоина белка.

Методика 1 [18]. Белок (0,015—1,0 мкм) растворяют в смеси тригидрата гексафтороацетона (1,0 мл) и воды (0,35 мл). По каплям при перемешивании добавляют свежеприготовленный прозрачный раствор тиоцианата аммония (100 мг) в смеси тригидрата гексафтороацетона (1,0 мл) и уксусного ангидрида (4,5 мл).

Смесь нагревают при 50 °С в течение 2 ч, затем добавляют еще 100 мг тиоцианата аммония и нагревают еще 18 ч. Для разрушения избытка уксусного ангидрида добавляют воду (3,0 мл). Тиогидантоин белка отделяют от побочных продуктов на сефадексе G-25.

Расщепление тиогидантоина белка.

Методика 1 [18]. Объединяют фракции элюата, содержащие тиогидантоин белка; растворитель удаляют в вакууме. Остаток растворяют в 1,0 мл 12 М HCl и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Соляную кислоту удаляют путем быстрого упаривания в вакууме. Остаток растворяют в 50%-ной уксусной кислоте, отщепленный тиогидантоин отделяют от укороченного белка гель-фильтрацией, как описано выше. Растворитель немедленно упаривают, добавляют небольшой объем метанола и без промедления (так как тиогидантоины неустойчивы на свету и на воздухе) идентифицируют тиогидантоин методом ТСХ.

18.4.1.3. Идентификация тиогидантоинов. После отщепления тиогидантоинов от небольших пептидов можно проводить аминокислотный анализ укороченного пептида и определять С-концевую аминокислоту по разности аминокислотного состава пептидов до и после отщепления. Для белков следует про-

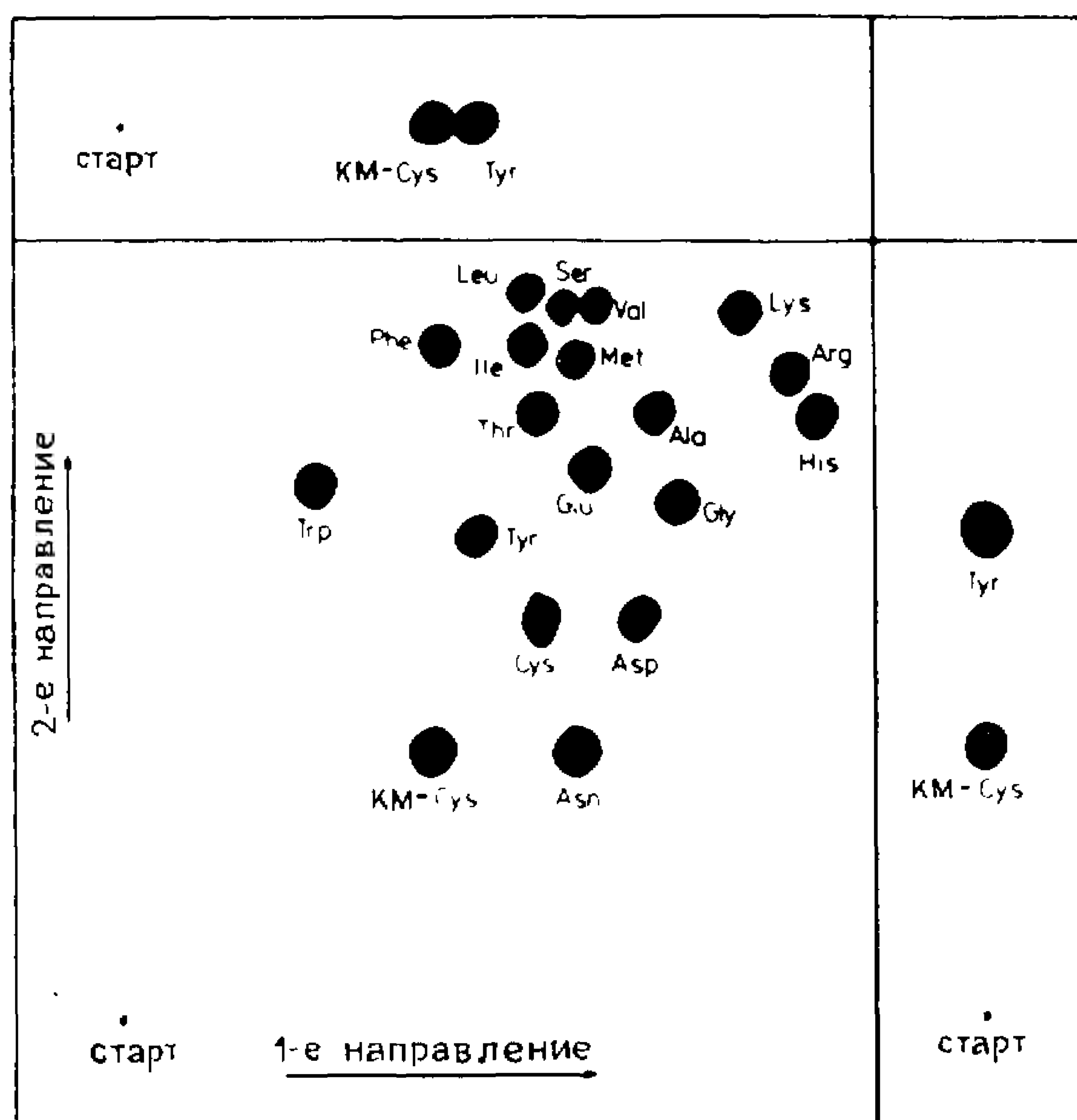


РИС. 18.10. Двумерная ТСХ тиогидантоинов аминокислот на полиамиде (пластинки 100×100 мм). Хроматография в первом направлении: ледяная уксусная кислота — вода (7 : 13); во втором направлении: смесь хлороформ — 95%-ный этанол — ледяная уксусная кислота (20 : 20 : 3), содержащая флуоресцентный индикатор 2,5-бис(5-*трет*-бутил-бензоксазолил-2)тиофен (0,025%). При УФ-освещении (254 нм) тиогидантоины проявляются в виде темных пятен на флуоресцирующем бледно-голубом фоне [70].

водить прямую идентификацию отщепленных тиогидантоинов, например при помощи ТСХ на силикагельных пластинках, пропитанных флуоресцирующим индикатором. Хроматографию проводят либо в системе гептан-*н*-бутанол — 99%-ная муравьиная кислота (95 : 65 : 30), либо в системе хлороформ — 95%-ный этанол — ледяная уксусная кислота (100 : 50 : 15) [18, 83, 84].

Более эффективна двумерная ТСХ на полиамидных пластинках (100× ×100 мм) в среде уксусная кислота — вода (7 : 13) в первом направлении и хлороформ — 95%-ный этанол — ледяная уксусная кислота (20 : 10 : 3), содержащая 0,025% 2,5-бис(5-*трет*-бутилбензоксазолил-2)тиофен, во втором направлении [70]. При УФ-облучении (254 нм) тиогидантоины аминокислот проявляются в виде темных пятен на бледно-голубом флуоресцирующем фоне (рис. 18.10).

Тиогидантоины аминокислот можно идентифицировать методом ГЖХ после их триметилсилилирования [23, 72], методом масс-спектрометрии [19, 72, 86, 87], а также после гидролиза тиогидантоинов до свободных аминокислот методами ионообменной хроматографии [84] и ГЖХ [70].

18.4.2. Расщепление при помощи цианамида

Предложена новая методика С-концевого последовательного расщепления белков (пептидов) [88], обладающего очевидными преимуществами по сравнению с тиоцианатным расщеплением

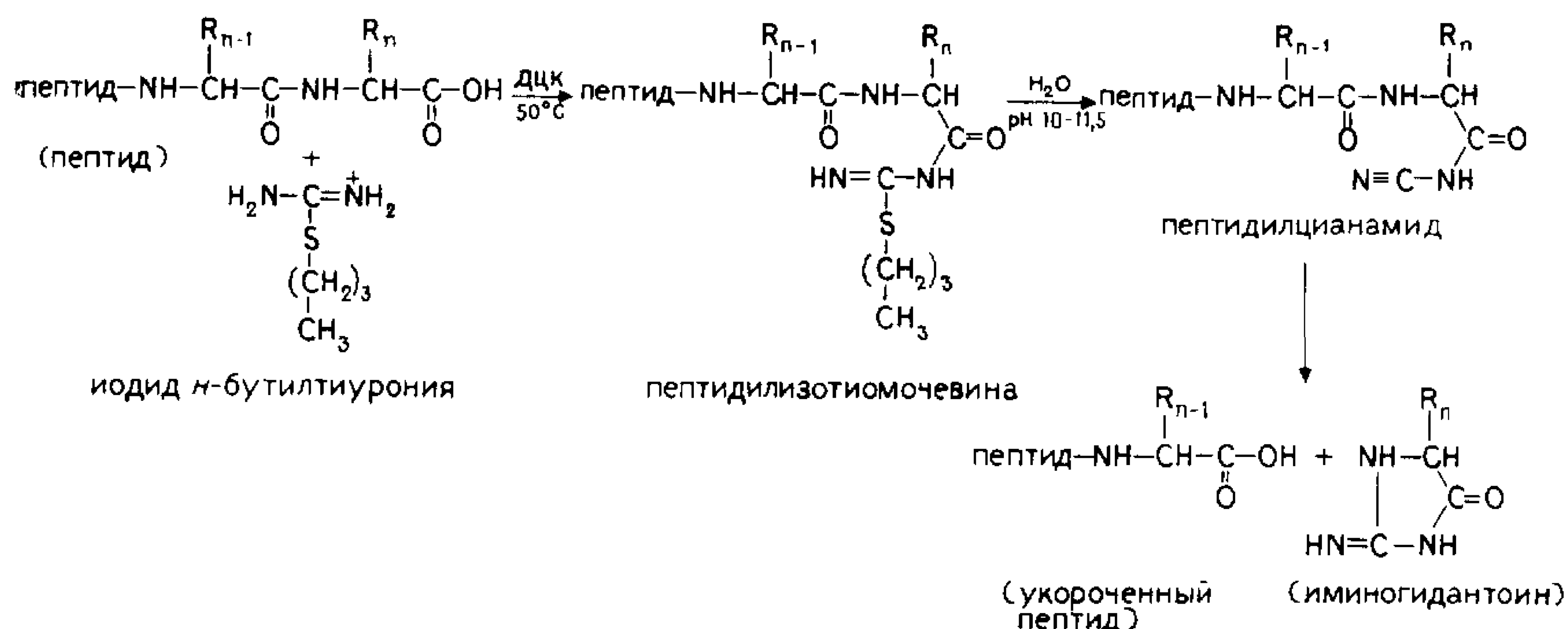


РИС. 18.11. Цианамидное расщепление [88].

(рис. 18.11). На первой стадии проводят при помощи карбодиимида конденсацию пептида с S-алкилтиурониевой солью, затем производное С-концевой аминокислоты отщепляют в водной среде при pH 10÷11,5. Реакция отщепления проходит в две четко различимые стадии. Алкильная часть ацилированной изотиомочевины удаляется при обработке основанием, давая ацилцианамид. Цианогруппа подвергается нуклеофильной атаке атомом азота пептидной связи. Затем происходят циклизация и отщепление иминогидантоина от укороченного пептида. Иминогидантоины — довольно полярные соединения и в целом проявляют хроматографические свойства исходных аминокислот. Их можно детектировать после ТСХ опрыскиванием пластинок раствором нитропруссида — феррицианида или ГЖХ триметилсилилированных производных [88].

Было найдено, что иодид S-*н*-бутилтиурония — наиболее реакционноспособный из всех изученных солей изотиурония. При взаимодействии пептида с этим реагентом в пиридине (безводном или содержащем ~1% концентрированной HCl) при 50 °С в течение 10—15 мин в присутствии 0,25 *М* карбодиимида (например, ДЦК) выход быстро протекающей реакции присоединения составил ~99%. Подобные результаты получены при использовании 0,1 *М* растворов реагентов и продолжительности реакции 20 мин. Присутствие воды снижает скорость реакции, особенно при использовании ДЦК, поэтому для получения больших выходов необходим большой избыток реагента. Реакцию отщепления можно проводить как с избытком, так и без избытка реагента. Единственным требованием является наличие водного раствора основания с pH 10—11,5. Были найдены условия реакции, близкие к оптимальным: пиридин — 1 *М* водный триметиламин (1 : 1), время реакции 10 мин при 50 °С. В этих ус-

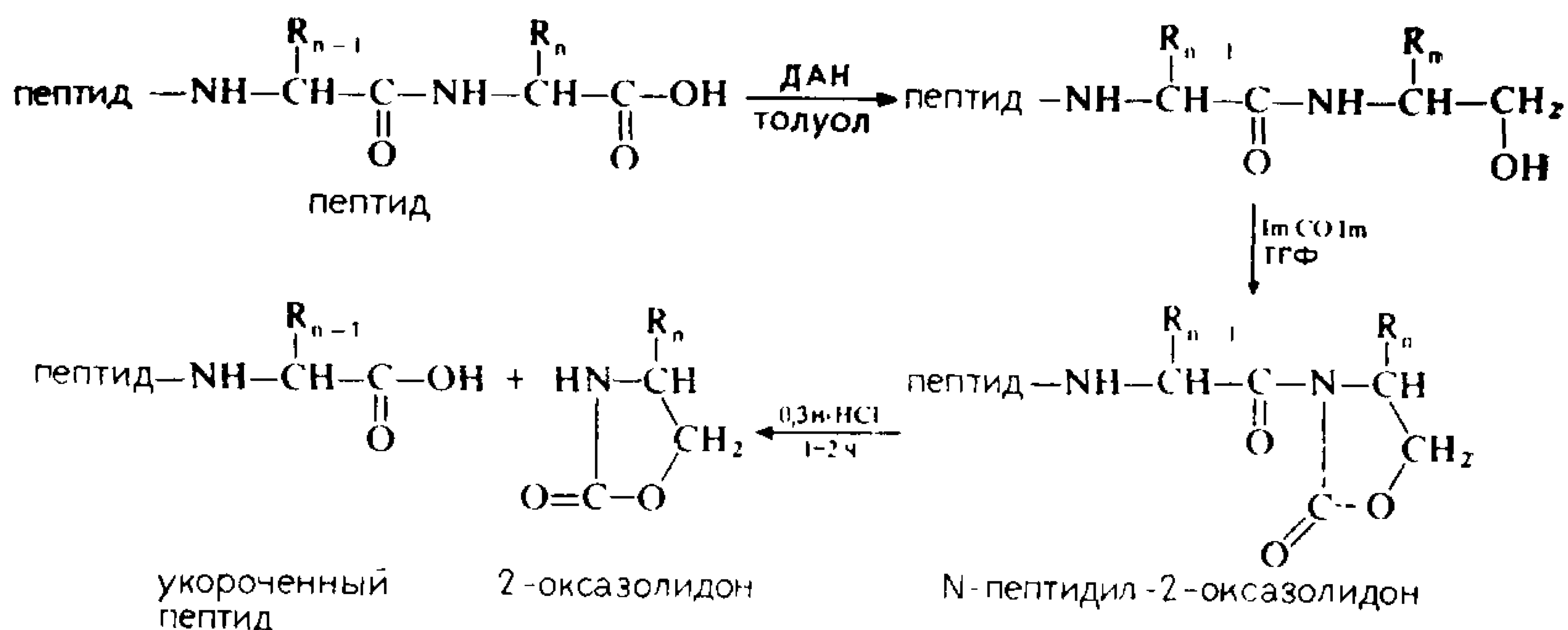


РИС. 18.12. Определение С-концевой последовательности избирательным восстановлением пептида дигидробис-(2-метоксиэтокси)алюминатом натрия (ДАН), превращением ациламиноспирта в пептидил-2-оксазолидон. Мягкий гидролиз последнего дает укороченный пептид и 2-оксазолидон С-концевой аминокислоты [75].

ловиях полный цикл расщепления модельного пептида проходит с выходом 96%. Метод находится в стадии разработки, но уже сейчас очевидны его ограничения — невозможность отщепления С-концевого Pro (из-за стерических затруднений) и Asp (из-за образования циклического ангидрида в присутствии карбодиимида) [88].

18.4.3. Другие химические методы расщепления

Предполагалось использование *п*-толуилкарбодиимида для получения ацилмочевины, при последующей обработке которой 0,01 М NaOH отщепляется N-толуилкарбонилтолуидид С-концевой аминокислоты [47]. Однако из-за того, что ацилмочевина гидролизуется с большим выходом, образуя исходный пептид, эта реакция не может быть положена в основу методики последовательного отщепления аминокислот.

Была сделана попытка применить метод селективного восстановления концевых аминокислот (разд. 18.3.3) для анализа последовательности С-концевых аминокислот [75]. Из пептидиламиноспирта при помощи карбонилдиимидазола можно получить N-ацил-2-оксазолидон, от которого в мягких условиях (0,3 М кислота, 1—2 ч) отщепляется 2-оксазолидон; при этом образуется укороченный пептид с новой С-концевой аминокислотой (рис. 18.12).

Предложены и другие методы последовательного С-концевого анализа [54, 61, 67]. Для С-концевого последовательного отщепления использовали алкоголиз оксазола (разд. 18.3.5) [68]. В этом случае еще предстоит преодолеть проблемы снижения

выхода остаточных аминокислот из-за неполноты их отщепления и превращения нового карбоксильного производного (полученного при отщеплении С-концевого остатка) в сложный эфир, пригодный для последовательного отщепления. В настоящее время разрабатывается твердофазный вариант этого метода.

18.4.4. Карбоксипептидазы

Впервые карбоксипептидаза использовалась в 1930 г. в виде неочищенного препарата для отщепления С-концевого Gly от молекулы глутатиона [28]. С тех пор этот фермент упоминается почти в каждой значительной работе по определению структуры белка. Опубликован обширный обзор по применению карбоксипептидазы для С-концевого анализа белков и пептидов [25].

Коммерчески доступны три типа карбоксипептидаз, обладающих различной специфичностью: А, В и С. Карбоксипептидаза А (из поджелудочной железы крупного рогатого скота) отщепляет с наибольшей скоростью С-концевые остатки, содержащие ароматические или большие алифатические группы в боковой цепи: Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Met, Val. С меньшими скоростями отщепляются Thr, Glu, His, Ala, HSer, Asn, Ser, Lys. Очень медленно высвобождаются Gly, Asp, Glu, Cys-SO_3H, КМ-Cys; Pro и Arg вообще не отщепляются. Скорость отщепления кислых аминокислот можно увеличить, понижая pH реакционной массы [79]. Карбоксипептидаза В (из поджелудочной железы свиньи) быстрее всех других аминокислот отщепляет основные аминокислоты (Lys и Arg). Карбоксипептидаза С выделена из ряда растительных источников, включая цитрусовые [101], листья апельсинового дерева [82], фасоли [93], ячменного солода [91], плесени [39, 77]. Этот фермент соединяет в себе специфичность карбоксипептидаз А и В и в то же время может отщеплять С-концевой Pro. Скорости высвобождения приблизительно одинаковы для всех аминокислот, за исключением Gly, который выщепляется очень медленно [3, 89]. Карбоксипептидаза Р получена из *Aspergillus* [39] и *Penicillum* [99]; поставляется фирмой Takara-shuro K. K. Она активна при pH 2,5 и имеет специфичность, сходную с таковой для карбоксипептидазы С. Аналогичный фермент (карбоксипептидаза Y) выделен из пекарских дрожжей; иногда при его использовании не удается отщепить Asp и основные аминокислоты [34]. Известны попытки использования карбоксипептидаз в твердофазном варианте анализа С-концевой последовательности [90].

Определение С-концевой аминокислоты (или последовательности аминокислот) при помощи карбоксипептидаз состоит из расщепления пептида (белка) соответствующим ферментом (смесью ферментов) и отбора аликвот анализируемого раствора

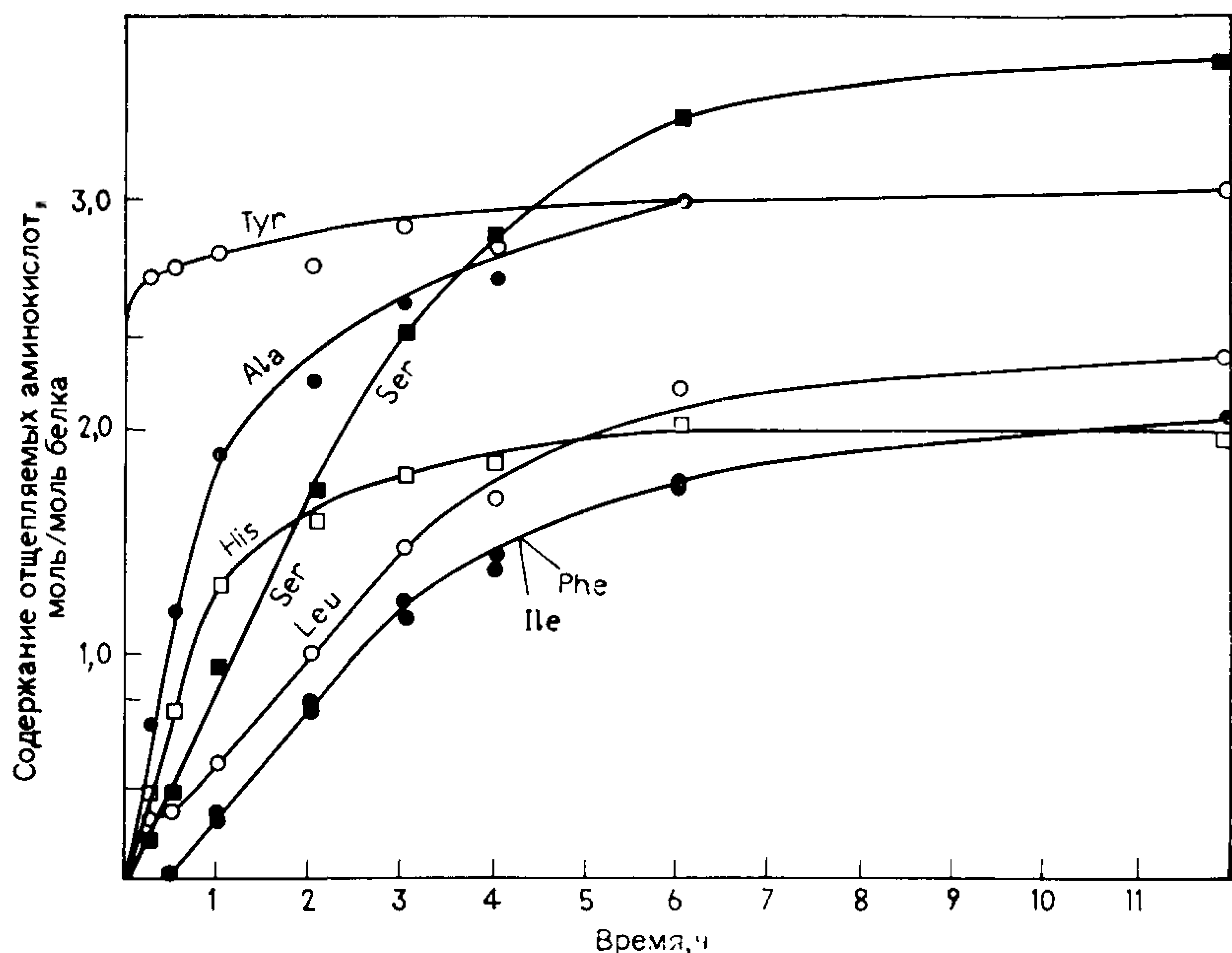


РИС. 18.13. Отщепление аминокислот альдолазы мышцы кролика карбоксипептидазой А [95].

через различные отрезки времени. Проводится количественный анализ аминокислот в каждой пробе, строится график зависимости молярного содержания свободных аминокислот (в пересчете на 1 моль образца) от времени расщепления (рис. 18.13) [3].

При работе с карбоксипептидазами следует учитывать следующие основные проблемы. Во-первых, многие препараты панкреатических ферментов А и В содержат эндонуклеазы (трипсин, химотрипсин), которые следует инактивировать добавлением диизопропилфторофосфата (ДИФФ). Коммерчески доступны обработанные таким образом карбоксипептидазы А и В. Во-вторых, следует учитывать различие в скоростях отщепления отдельных аминокислот, зависящее не только от природы С-концевого остатка, но и от природы предпоследней аминокислоты, что может осложнить определение последовательности. Когда вслед за трудно отщепляемым остатком стоит легко отщепляемый, то скорости высвобождения этих двух аминокислот будут почти неразличимы. Еще одним осложнением является случай, когда в С-концевой последовательности стоят подряд несколько остатков одной аминокислоты. По всем вышеупомянутым причинам при использовании карбоксипептидаз обычно

трудно вывести последовательность более трех-четырех С-концевых аминокислот. Наконец, пики Asn, Gln и Ser в стандартных условиях аминокислотного анализа накладываются друг на друга. При наличии такого пика на хроматограмме следует отобрать аликвоту гидролизата, отделить и отбросить фермент и исследуемый белок, гидролизовать остаток, провести аминокислотный анализ кислотного гидролизата. Наличие Asp или Glu указывает на присутствие Asn или Gln в пике, «соответствующем» Ser.

18.4.4.1. Методика определения при помощи карбоксипептидаз А и В.
Предварительная обработка фермента.

Препараты карбоксипептидаз А и В бычно содержат свободные аминокислоты и протеолитические ферменты. Эндопептидазы можно инактивировать обработкой фермента (1 мг/мл) 50-кратным избытком ДИФФ (15 мкл 0,1 М ДИФФ в сухом изопропаноле на 1 мг фермента) в 0,1 М буфере (бикарбонат аммония или ацетат N-этилморфолина, pH 8,5) в течение 1 ч при комнатной температуре. Реагент и свободные аминокислоты быстро отделяют диализом или гель-фильтрацией на сефадексе G-25.

Свободные аминокислоты можно также удалить из раствора, содержащего фермент, путем суспендирования фермента в воде и последующего центрифугирования. При низкой ионной силе раствора карбоксипептидазы А и В нерастворимы и легко выпадают в осадок. Жидкость над осадком, содержащую свободные аминокислоты, отбрасывают, а осадок фермента растворяют в небольшом объеме 2 М бикарбоната аммония [25].

Предварительный эксперимент.

Перед проведением количественного анализа следует убедиться в том, что отщепление действительно происходит, подобрать оптимальные соотношения фермента и субстрата, подобрать продолжительность расщепления. Для белков обычно необходимы предварительная денатурация и перевод в растворенное состояние. Расщепление можно проводить в 6 М мочевине [31] или в 0,056 М ДСН [30]. Количество анализируемого материала зависит от чувствительности используемого метода определения.

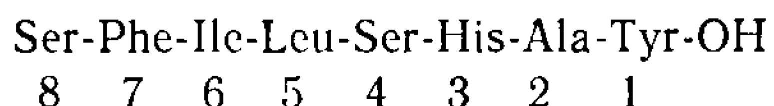
Денатурированный белок (5—50 нмоль) растворяют в 100—200 мкл 0,2 М N-этилморфолин-ацетатного буфера (pH 8,5). Добавляют карбоксипептидазу А (10—50 мкг) или В (5—20 мкг), обработанную ДИФФ; смесь инкубируют при 37 °С в течение 4 ч. Аналогично проводят контрольный опыт (без белка). Процесс останавливают подкислением реакционной массы (ТФУ, уксусной или соляной кислотами) до pH 2. Образующийся осадок удаляют центрифугированием, надосадочную жидкость анализируют на содержание свободных аминокислот.

Если в ходе предварительного эксперимента обнаруживается высвобождение многих аминокислот, то следует использовать низкое отношение фермент : субстрат (1 : 100 или 1 : 200) или проводить отщепление при комнатной температуре. Если аминокислоты высвобождаются медленно, то в последующем опыте используют высокое соотношение фермент : субстрат (1 : 20). Если в предварительном опыте с карбоксипептидазами А и В не обнаружено значительных количеств свободных аминокислот, то следует применить методы С-концевого химического анализа или выделить С-концевой пептид и по результатам этих опытов судить о причинах неудач с расщеплением белка при помощи карбоксипептидаз.

Количественное определение проводится после выбора оптимальных условий гидролиза. Количество анализируемого образца зависит как от чувствительности используемых методов идентификации, так и от числа отбираемых аликвот. Рекомендуется выбрать следующие интервалы времени 0,5,

1, 2, 4, 8 и 16 ч; количество белка в каждой аликвоте составляет 1—10 нмоль (в зависимости от типа анализатора).

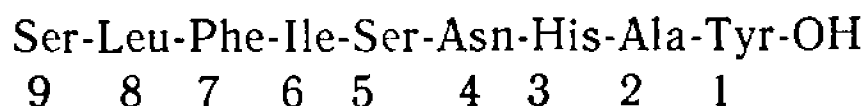
Интерпретация. В качестве типичного примера выбора условий эксперимента рассмотрим использование карбоксипептидазы А для определения структуры С-концевой части альдолазы мышцы кролика (рис. 18.13) [95]. При использовании карбоксипептидазы В в гидролизате отсутствовали свободные аминокислоты. Первоначально предполагалась следующая последовательность аминокислот:


Ser-Phe-Ile-Leu-Ser-His-Ala-Tyr-OH
8 7 6 5 4 3 2 1

Вызывали недоумение низкие выходы аминокислот после отщепления третьего, пятого, шестого, седьмого остатков, что говорило о плохом отщеплении His (или об отсутствии его) в третьем положении. Более высокие, чем для остальных аминокислот, выходы Ser (4-й остаток) позволяли предположить, что в изучаемой области содержится более одного остатка Ser, хотя установить точное местоположение второго Ser было невозможно. В литературе [3] указывалось, что с помощью карбоксипептидаз редко удается надежно определить последовательность более трех-четырех остатков, хотя и существует большой соблазн сделать выводы, выходящие за рамки надежной интерпретации результатов.

Анализ данных, представленных на рис. 18.13, позволяет вывести следующую последовательность первых четырех аминокислот: Ser-His-Ala-Tyr. Предполагалось [95], что пятым остатком является Leu, за ним следуют, согласно измерению скорости высвобождения, Ile и Phe. Эти аминокислоты отщеплялись в одинаковых количествах, но можно предположить указанную последовательность их расположения в цепи, так как известно, что карбоксипептидаза А отщепляет Phe в 26 раз быстрее, чем Ile. Размещение Leu в пятом положении представляется неправомерным, так как скорость его отщепления приблизительно равна скорости высвобождения Ile и Phe, превышая последние по абсолютному значению лишь на 0,25 моля для каждой точки определения.

После определения полной аминокислотной последовательности альдолазы мышцы кролика [49, 50] аминокислотная последовательность С-концевой области выглядела следующим образом:


Ser-Leu-Phe-Ile-Ser-Asn-His-Ala-Tyr-OH
9 8 7 6 5 4 3 2 1

Эти данные совпадают с результатами определения первых трех аминокислот и с предположением о том, что Ile находится

ближе к С-концу молекулы, чем Phe. Однако указанная последовательность отличается от той, что была выделена по результатам С-концевого анализа белка. Во-первых, «Ser» в четвертом положении оказался Asn, который совпадает с Ser в обычных условиях аминокислотного анализа и неотличим от Ser без дополнительной проверки другими методами. Во-вторых, лишний остаток «Ser», явно присутствующего в последовательности (рис. 18.13), оказался в пятом положении с С-конца, а не в восьмом. В-третьих, Leu, высвобождающийся с той же скоростью, что и Ile, и Phe, попал в восьмое, а не в пятое положение. Было найдено, что заниженные выходы His и последующих остатков объясняются частичным дезаминированием остатка Asn в пятом положении; связь Asp-His очень устойчива к действию карбоксипептидазы А [50].

18.4.4.3. Отщепление с помощью карбоксипептидазы С. Доступны коммерческие препараты карбоксипептидазы С из листьев апельсинового дерева [89] и карбоксипептидазы Y из дрожжей [34]. Фермент из первого источника может содержать переменные количества трипсина, химотрипсиноподобной активности, аминопептидазы, которые инактивируются предварительным инкубированием с 0,001 М ДИФФ при pH 5,3—8,0. Такая же обработка частично ингибирует карбоксипептидазу С из цитрусовых и полностью — карбоксипептидазу Y из дрожжей.

Стратегия и методика применения карбоксипептидаз С и Y для определения С-концевой последовательности аналогичны изложенным для ферментов А и В. Отщепление проводят в 0,05 М цитрате натрия или ацетате пиридина (pH 5,5) при соотношении фермент : субстрат=0,1÷1,0% (по массе). Карбоксипептидаза Y иногда не отщепляет Asp или основные аминокислоты [34].

18.5. Заключение

Успешное определение длинных С-концевых последовательностей до сих пор остается недостижимым. Появление усовершенствованных методик тиоцианатного отщепления, новых подходов (цианамидный метод, селективное восстановление, определение аминокислот в виде альдегидов, алкоголиз оксазолов) позволяет надеяться на появление в будущем универсального метода определения протяженных последовательностей. Однако на этом пути предстоит преодолеть много проблем. Люди, взявшиеся в наши дни решать эту задачу, заслуживают восхищения за свое мастерство и мужество, ибо многие до них пытались создать реально работающий метод и потерпели неудачу [67а].

Литература

1. *Akabori S., Ohno K., Narita K.*, Bull. Chem. Soc., Japan, **25**, 214—218 (1952).
2. *Akabori S., Ohno K., Ikenaka T., Okada Y., Hanafusa H., Haruna I., Tsugita A., Sugae K., Matsushima T.*, Bull. Chem. Soc., Japan, **29**, 507—518 (1956).
3. *Ambler R. P.*, Methods Enzymol., **25**, 143—154 (1972).
4. *Baba T., Sugiyama H., Seto S.*, J. Biochem. (Tokyo), **72**, 1571—1573 (1972).
5. *Barrell B. G., Air G. M., Hutchison C. A.*, Nature (Lond.), **264**, 34—41 (1976).
6. *Berget S. M., Moore C., Sharp P. A.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 3171—3175 (1977).
7. *Blackburn S.*, Protein Sequence Determination, Dekker, New York, pp. 191—199 (1970).
8. *Blombäck B.*, Methods Enzymol., **11**, 398—411 (1967).
9. *Boissonnas R. A., Haselbach C. H.*, Helv. Chim. Acta, **36**, 576—581 (1953).
10. *Bornstein P.*, Biochemistry, **9**, 2408—2421 (1970).
11. *Bradbury J. H.*, Nature (Lond.), **178**, 912—913 (1956).
12. *Braun V., Schroeder W. A.*, Arch. Biochem. Biophys., **118**, 241—252 (1967).
13. *Braunitzer G.*, Chem. Ber., **88**, 2025—2036 (1955).
14. *Cappugi G., Nassi P., Treves C., Ramponi G.*, Experientia, **27**, 237—239 (1971).
15. *Carlton B. C., Yanofsky C.*, J. Biol. Chem., **238**, 636—639 (1963).
16. *Catterall J. F., O'Malley B. W., Robertson M. A., Staden R., Tanaka Y., Brownlee G. G.*, Nature (Lond.), **275**, 510—513 (1978).
17. *Chibnall A. C., Rees M. W.*, Biochem. J., **68**, 105—111 (1958).
18. *Cromwell L. D., Stark G. R.*, Biochemistry, **8**, 4735—4740 (1969).
19. *Darbre A.*, Methods Enzymol., **47**, 357—369 (1975).
20. *Degani Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **13**, 1—11 (1974).
21. *Dopheide T. A., Ward C. W.*, J. Gen. Virol., **52**, 367—370 (1981).
22. *Duggleby R. G., Kaplan H.*, Anal. Biochem., **65**, 346—354 (1975).
23. *Dwulet F. E., Gurd F. R. N.*, Anal. Biochem., **82**, 385—395 (1977).
24. *Fiers W., Contreras R., Haegeman G., Rogiers R., Van de Voorde A., Van Heuverswyn H., Van Herreweghe J., Volckaert G., Ysebaert M.*, Nature (Lond.), **273**, 113—120 (1978).
25. *Fraenkel-Conrat H., Harris J. I., Levy A. L.*, Methods Biochem. Anal., **2**, 359—425 (1955).
26. *Fromageot C., Jutisz M., Meyer D., Penasse L.*, Biochem. Biophys. Acta, **6**, 283—289 (1950).
27. *Furka A., Sebestyen F., Karacsonyi T.*, FEBS Lett., **6**, 34—36 (1970).
28. *Grassman W., Dyckerhoff H., Eibeler H.*, Hoppe-Seyer's Z. Physiol. Chem., **189**, 112—120 (1930).
29. *Greenstein J. P., Winitz M.*, Chemistry of the Amino Acids, vol. 2, Wiley, New York, pp. 1512—1687 (1961).
30. *Guidotti G.*, Biochem. Biophys. Acta, **42**, 177—179 (1960).
31. *Halsey Y. D., Neurath H.*, J. Biol. Chem., **217**, 247—252 (1955).
32. *Hamada T., Yonemitsu O.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **50**, 1081—1086 (1973).
33. *Hargrave P. A., Wold F.*, Int. J. Peptide Protein Res., **5**, 85—89 (1973).
34. *Hayashi R.*, Methods Enzymol., **47**, 84—93 (1977).
35. *Hoare D. G., Koshland D. E.*, J. Biol. Chem., **242**, 2447—2453 (1967).
36. *Holcomb G. N., James S. A., Ward D. N.*, Biochemistry, **7**, 1291—1296 (1968).
37. *Horn M. J., Laursen R. A.*, FEBS Lett., **36**, 285—288 (1973).
38. *Hsieh W. T., Gundersen L. E., Vestling C. S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **43**, 69—75 (1971).

39. *Ichishima E.*, Biochem. Biophys. Acta, **258**, 274—288 (1972).
40. *Jacobson G. R., Schaffer M. H., Stark G. R., Vanaman T. C.*, J. Biol. Chem., **248**, 6583—6591 (1973).
41. *Johnson T. B., Nicolet B. H.*, J. Am. Chem. Soc., **33**, 1973—1978 (1911).
42. *Jones B. N., Pääbo S., Stein S.*, J. Liquid Chromatogr., **4**, 565—586 (1981).
43. *Jörnvall H.*, Abstr. 9th Internat. Congr. Biochem. Colloquium D, Abstract Db 13, p. 454 (1973).
44. *Kassell B., Krishnamurti C., Friedman H. L.*, In: Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Second Internat. Conf., Previero A., Coletti-Previero M.-A. (Eds.), North Holland, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 39—48 (1977).
45. *Kauffmann T., Boettcher F.-P.*, Chem. Ber., **92**, 2707—2716 (1959).
46. *Kawanishi Y., Iwai U., Ando T.*, J. Biochem. (Tokyo), **56**, 314—324 (1964).
47. *Khorana H. G.*, J. Chem. Soc., 2081—2088 (1952).
48. *Kubo H., Nakajima T., Tamura Z.*, Chem. Pharm. Bull., **19**, 210—211 (1971).
49. *Lai C. Y.*, Arch. Biophys., **166**, 358—368 (1975).
50. *Lai C. Y., Chen C., Horecker B. L.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **40**, 461—468 (1970).
51. *Laursen R. A.*, Methods Enzymol., **47**, 277—288 (1977).
52. *Leder P., Tilghman S. M., Tiemeier D. C., Polsky F. I., Seidman J. G., Edgell M. H., Enquist L. W., Leder A., Norman B.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **42**, 915—920 (1977).
53. *Levy A. L.*, Nature (Lond.), **174**, 126—127 (1954).
54. *Loudon G. M., Parham M. E.*, Tetrahedron Lett., no. 5, 437—440 (1978).
55. *Machleidt W., Wachter E.*, Methods Enzymol., **47**, 263—277 (1977).
56. *McReynolds L., O'Malley B. W., Nisbet A. D., Fothergill J. E., Givol D., Fields S., Robertson M., Brownlee G. G.*, Nature (Lond.), **273**, 723—728 (1978).
57. *Matsuo H., Narita K.*, In Protein Sequence Determination, Needleman S. B. (Ed.), 2nd edn., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 104—113 (1975).
58. *Matsuo H., Kawazoe Y., Ohnishi M., Sato M., Tatsuno T.*, Abstracts of Third Symposium on Peptide Chem., Osaka University, Osaka, Japan, Nov. 1964, p. 30 (1964).
59. *Matsuo H., Fujimoto Y., Tatsuno T.*, Tetrahedron Lett., no. **39**, 3465—3472 (1965).
60. *Matsuo H., Fujimoto Y., Tatsuno T.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **22**, 69—74 (1966).
61. *Miller M. J., Loudon G. M.*, J. Am. Chem. Soc., **97**, 5295—5297 (1975).
62. *Narita K., Ohta Y.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **32**, 1023—1028 (1959).
63. *Naughton M. A., Hagopian H.*, Anal. Biochem., **3**, 276—284 (1962).
64. *Neurath H.*, In The Enzymes, Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. (Eds.), 2nd edn, vol. 4, Academic Press, New York, pp. 11—36 (1960).
65. *Niu C., Fraenkel-Conrat H.*, J. Am. Chem. Soc., **77**, 5882—5885 (1955).
66. *Ohno K.*, J. Biochem. (Tokyo), **41**, 345—350 (1954).
67. *Parham M. E., Loudon G. M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **80**, 7—13 (1978).
68. *Perham R. N.*, In: Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. Second Internat. Conf., Previero A., Coletti-Previero M.-A. (Eds.), North Holland, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 293—296 (1977).
69. *Previero A., Coletti-Previero M.-A.*, ibid., pp. 49—56 (1977).
70. *Previero A., Derancourt J., Coletti-Previero M.-A., Laursen R. A.*, FEBS Lett., **33**, 135—138 (1973).
71. *Rangarajan M., Darbre A.*, Biochem. J., **147**, 435—438 (1975).
72. *Rangarajan M., Darbre A.*, Biochem. J., **157**, 307—316 (1976).

73. *Rangarajan M., Ardrey R. E., Darbre A.*, J. Chromatogr., **87**, 499—512 (1973).
74. *Sakano H., Rogers J. H., Huppi K., Brack C., Traunecker A., Maki R., Wall R., Tonegawa S.*, Nature (Lond.), **277**, 627—633 (1979).
75. *Saund A. K., Prasad B., Koul A. K., Bachhawat J. M., Mathur N. K.*, Int. J. Peptide Protein Res., **5**, 7—10 (1973).
76. *Schlack P., Kumpf W.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **154**, 125—170 (1926).
77. *Shaw R.*, Biochem. Biophys. Acta, **92**, 558—567 (1964).
78. *Simpson R. J., Neuberger M. R., Liu T.-Y.*, J. Biol. Chem., **251**, 1936—1940 (1976).
79. *Slobin L. I., Carpenter F. H.*, Biochemistry, **5**, 499—508 (1966).
80. *Smyth D., Utsumi S.*, Mature (Lond.), **216**, 332—335 (1967).
81. *Smyth D., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **237**, 1845—1850 (1962).
82. *Sprössler B., Heilmann H. D., Grampp E., Uhlig H.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **352**, 1524—1530 (1971).
83. *Stark G. R.*, Biochemistry, **7**, 1796—1807 (1968).
84. *Stark G. R.*, Methods Enzymol., **25**, 369—384 (1972).
85. *Stark G. R., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **235**, 3177—3181 (1960).
86. *Suzuki T., Matsui S., Tuzimura K.*, Agric. Biol. Chem., **36**, 1061—1063 (1972).
87. *Suzuki T., Song K.-D., Itagaki Y., Tuzimura K.*, Org. Mass Spectrom., **11**, 557—568 (1976).
88. *Tarr G. E.*, In: Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, Proc. First Internat. Conf., Laursen R. A. (Ed.), Pierce, Rockford, Illinois, pp. 139—147 (1975).
89. *Tschesche H.*, Methods Enzymol., **47**, 73—84 (1977).
90. *Tsugita A., Broek R., Van den*, In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, Proc. Third Internat. Conf., Birr C. (Ed.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 359—369 (1980).
91. *Visuri K., Mikola J., Enari T. M.*, Eur. J. Biochem., **7**, 193—199 (1969).
92. *Ward C. W., Dopheide T. A.*, Virology, **95**, 107—118 (1979).
93. *Wells J. R. E.*, Biochem. J., **97**, 228—235 (1965).
94. *Williams M. J., Kassell B.*, FEBS Lett., **54**, 353—357 (1975).
95. *Winstead J. A., Wold F.*, J. Biol. Chem., **239**, 4212—4216 (1964).
96. *Yamashita S.*, Biochem. Biophys. Acta, **229**, 301—309 (1971).
97. *Yamashita S., Ishikawa N.*, Proc. Hoshi Coll. Pharm., **13**, 136—138 (1971).
98. *Yamashita S., Ishikawa N.*, In: Chemistry and Biology of Peptides: Proc. Third American Peptide Symp., Meinhofer J. (Ed.), Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, pp. 701—703 (1972).
99. *Yokoyama S., Ichishima E.*, Agr. Biol. Chem., **36**, 1259—1261 (1972).
100. *Zabin I., Fowler A. V.*, J. Biol. Chem., **247**, 5432—5435 (1972).
101. *Zuber H.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **349**, 1337—1352 (1968).

Глава 19

ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ЭЛЕКТРОННОГО УДАРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

А. ДЕЛЛ (A. DELL, *Department of Biochemistry, Imperial College of Science and Technology, London SW7 2AZ, U.K.*)

19.1. Введение

В настоящей главе обсуждаются методология и практические результаты определения аминокислотной последовательности пептидов в смеси, подвергнутой ацетилированию и метилированию, методом низкоразрешающей масс-спектрометрии электронного удара. Такой подход успешно использовался при установлении первичной структуры ряда белков, таких, как рибитолдегидрогеназа [1], хлорамфениколацетилтрансфераза [2, 3], азурин из *Pseudomonas* [4], дигидрофолатредуктаза из *L. casei* (единственный белок, полная аминокислотная последовательность которого определена одним лишь масс-спектрометрическим методом) [5, 6], и пептидов, аминокислотная последовательность которых не устанавливалась классическими методами белковой химии из-за присутствия N-концевых защитных групп, наличия в цепи остатков необычных аминокислот, из-за серьезных трудностей, связанных с выделением индивидуальных веществ или в силу каких-либо иных причин [7—15].

19.2. Требования к анализируемым пептидам

19.2.1. Размеры молекул

Длина пептидов, которые можно анализировать методом масс-спектрометрии электронного удара, определяется главным образом их летучестью, и обычно число аминокислотных остатков в таких соединениях не превышает десяти. В случае пептидов, построенных преимущественно из остатков небольших гидрофобных аминокислот (глицина, валина, аланина), достаточно летучими могут оказаться и двадцатичленные соединения. Удается анализировать масс-спектрометрически и более крупные пептиды, но лишь в том случае, если в ионном источнике они могут термически распадаться на мелкие хорошо летучие фрагменты, аминокислотная последовательность которых устанавливается по масс-спектру.

19.2.2. Количество пробы

Количество пептида, необходимое для установления его строения методом масс-спектрометрии, определяется главным образом размерами и полярностью соединения и его способностью к фрагментации. Если применять приборы, чувствительность которых не уступает чувствительности масс-спектрометров MS-50 фирмы KRATOS или ZAB фирмы VG Analytical, то обычно 30—50 нмоль десятичленного пептида хватает для проведения одного анализа. Однако для надежной интерпретации масс-спектров сложных смесей почти всегда приходится параллельно проводить эксперименты с дейтеромеченными пептидами (разд. 19.6.3), что вдвое увеличивает необходимое для анализа количество вещества.

19.2.3. Чистота образцов

Поскольку описываемая здесь стратегия масс-спектрометрического определения аминокислотной последовательности разработана для пептидов в смеси, то требования к возможному присутствию примесных пептидов в пробе не более жесткие, чем при определении первичной структуры пептидов дансил-эдмановским методом. Преимущество же масс-спектрометрического метода состоит в том, что часто наряду с определением аминокислотной последовательности нужного пептида (или пептидов) удается установить первичную структуру и минорных компонентов. Следует помнить, что категорически недопустимо присутствие в пробе примесей непептидной природы, таких, как компоненты парафильма, соли, вещества смазок и пластификаторы. Например, присутствие следовых количеств кремнийорганических соединений из силиконовой смазки практически полностью подавляет ионизацию пептидов электронным ударом.

19.3. Требования к аналитическим приборам

Масс-спектрометры, которые можно использовать для установления первичной структуры пептидов должны удовлетворять двум основным требованиям. Они должны обладать высокой чувствительностью и при максимальной чувствительности регистрировать ионы с массами до 1000 а. е. м. В своих исследованиях автором использовались масс-спектрометры MS-902 и MS-50 фирмы KRATOS и ZAB фирмы VG Analytical, но можно применять и другие приборы. Приобретение масс-спектрометра для небольшой научной группы, занятой установлением структуры белков, может показаться слишком расточительным предприятием. Однако, если принять во внимание универсальность

этого прибора, который можно использовать для решения многих других проблем биохимии, то нужно пересмотреть свое отношение к этому; следует предпочесть масс-спектрометр прибору, предназначенному только для определения аминокислотной последовательности белков.

19.4. Способы подготовки проб

Присутствие в белковой молекуле разнообразных функциональных групп было непосредственной причиной того, что на разработку совершенных методов химического превращения водорастворимых полярных пептидов неизвестной структуры в растворимые в хлороформе летучие производные, поддающиеся исследованию методом масс-спектрометрии электронного удара, ушло более десяти лет. Систематическое исследование различных способов химической модификации пептидов [16—20] привело к созданию универсального метода получения летучих производных пептидов для масс-спектрометрического анализа. Метод дает возможность модифицировать пептиды непосредственно в смеси, содержащей 5—100 нмоль каждого из компонентов [21, 22] независимо от их аминокислотной последовательности. Схема такого превращения пептидов в N-ацетил-N,O,S-перметилпроизводные изображена на рис. 19.1. Аргининсодержащие соединения перед такой химической модификацией обычно переводят в орнитилпептиды (рис. 19.2) [22]. Для определения аргининсодержащих пептидов в исследуемой пробе, часть смеси подвергают аминокислотному анализу или аналитическому электрофорезу с последующим окрашиванием [23] (разд. 8.14.3). Использование последнего метода в современной стратегии определения аминокислотной последовательности представляется достаточно простым, поскольку аналитическим электрофорезом контролируются этапы хроматографического разделения.

19.4.1. Очистка реактивов

Метанол, хлороформ и уксусный ангидрид марки «ч.д.а.» обычно применяют без предварительной очистки. Качество метилиодида зависит от способа производства и каждый раз должно тщательно контролироваться. С этой целью метилиодид используют для метилирования пептида, спектр метилпроизводного которого хорошо известен. Сравнением масс-спектров стандартного и анализируемого соединений оценивается количество примесей в используемом реактиве. При наличии большого количества примесей применять реактив нецелесообразно. Попытки очистить реактив перегонкой приводят к удалению стабилизирующих реактив добавок. Диметилсульфоксид очищают, перегоняя над гидридом кальция при пониженном давлении, хранят тоже над гидридом кальция. При использовании гидрида натрия, поставляемого обычно в виде суспензии в масле, реактив необходимо предварительно многократно промыть высушенным над натрием диэтиловым эфиром, а затем

$$NH_2-CH(R)-C(=O)-NH-CH((CH_2)_4NH_2)-C(=O)-\cdots\cdots CO_2H$$

$\downarrow (CH_3CO)_2O \; CH_3OH$

$$CH_3-C(=O)-NH-CH(R)-C(=O)-NH-CH((CH_2)_4-NH-C(=O)-CH_3)-C(=O)-\cdots\cdots CO_2H$$

$\downarrow$ 1. $CH_3-S(=O)-CH_2$; 2. CH_3I 75с

$$CH_3-C(=O)-N(CH_3)-CH(R)-C(=O)-N(CH_3)-CH((CH_2)_4-N(CH_3)-C(=O)-CH_3)-C(=O)-\cdots\cdots CO_2CH_3$$

РИС. 19.1. Ацетилирование и исчерпывающее метилирование пептидов для масс-спектрометрирования [22].

$$/\!\sim CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=NH)NH_2 \xrightarrow{NH_2NH_2\, H_2O/H_2O\ (1:1)} /\!\sim CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$$

РИС. 19.2. Превращение аргининовых остатков в остатки орнитина [22].

просушить в вакууме. Полученный серый порошок может длительное время (до года) храниться в герметически закрытом сосуде при условии лишь кратковременного воздействия атмосферного воздуха в моменты открывания.

19.4.2. Лабораторная посуда

Чтобы свести к минимуму потери исследуемых веществ, все химические превращения следует проводить в одной и той же небольшой (100×10 мм) стеклянной пробирке с притертой пробкой. Для добавления реактивов лучше всего использовать пастеровские пипетки.

19.4.3. Гидразинолиз

К 5—100 нмоль пептида добавляют 50 мкл водного раствора гидразингидрата (1 : 1) и раствор выдерживают в течение 12 мин при 80 °С. После этого реакционную массу охлаждают, добавляют 50 мкл воды, замораживают раствор жидким азотом или смесью этанола с сухим льдом и вакуумируют с помощью форвакуумного насоса до полного улетучивания влаги (удобно пользоваться лиофильной сушилкой). Замороженную таким образом пробу медленно расплавляют и доводят ее температуру до комнатной. Такая процедура сопровождается выделением растворенных в реакционной массе газов. Остатки гидразингидрата удаляют, добавляя дважды к образцу по 50 мкл воды, которую упаривают в вакууме.

19.4.4. Ацетилирование

Обработка уксусным ангидридом при комнатной температуре в течение одной минуты приводит к защите α-аминогруппы пептида, а в течение трех часов — к полной модификации ε-аминогрупп. В присутствии подходящего основания обе аминогруппы ацетилируются за время около одной минуты. Ниже приведены две методики ацетилирования, каждая из которых пригодна для модификации пептидов с неизвестным аминокислотным составом.

19.4.4.1. Продолжительное ацетилирование. Образец растворяют в 100 мкл воды, к раствору добавляют 500 мкл метанольного раствора уксусного ангидрида (3 : 1) и реакционную массу выдерживают в течение 3 ч.

Избытки реагентов удаляют вакуумированием, при котором не наблюдается перебрасывания реакционной массы.

19.4.4.2. Кратковременное ацетилирование. Пробу растворяют в 100 мкл раствора бикарбоната натрия, приготовленного так, чтобы в 1 мл воды содержался 1 мг соли, и по истечении 30 с добавляют раствор уксусного ангидрида в метаноле (1 : 3). Примерно через минуту реакционную массу откачивают сначала водоструйным насосом, принимая во внимание возможность перебрасывания, а затем форвакуумным или применяют лиофильную сушку.

19.4.5. Перметилирование

Ацетилпептиды перметилируются следующим образом. Сначала готовится необходимое основание — метилсульфинильный карбанион. Для этого к 3—4 мл диметилсульфоксида добавляют гидрид натрия (два полных микрошпателя) и реакционную массу выдерживают 20 мин при 90 °С. О ходе реакции судят по интенсивности окрашивания раствора и по скорости выделения пузырьков водорода. Если за это время реакционная масса приобретает оран-

жево-коричневый цвет и выделение водорода практически прекращается, то считают, что реакция прошла до конца. Если выделение водорода прекращается до появления нужного окрашивания, то к реакционной массе следует добавить гидрид натрия (еще один микрошпатель) и продолжать реакцию до приобретения реакционной смесью нужной окраски. Если в процессе проведения реакции раствор окрашивается в зеленый или красный цвет, то его следует вылить. По окончании реакции массу охлаждают и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об./мин. При этом в верхней части пробирки собирается жидкость цвета светлого меда, которая содержит необходимое для дальнейшего применения основание.

К растворенному в капле диметилсульфоксида ацетилпептиду добавляют 20—30 капель раствора, содержащего метилсульфинильный карбанион. Чтобы убедиться, что основание добавлено в избытке, капают реакционной смесью на кристаллик трифенилметана, который в этом случае окрашивается в глубокий красный цвет. Примерно через минуту после добавления избытка основания к реакционной массе добавляют 500 мл метилиодида и проводят метилирование в течение 70 с [21, 22]. По прошествии указанного времени реакцию останавливают добавлением 2 мл воды. Перметилированные ацетилпептиды сразу же экстрагируют 1 мл хлороформа, который предварительно дважды промывают 2 мл воды, и хлороформный экстракт упаривают в потоке азота. Для окончательного удаления следов воды и хлороформа продукт вакуумируют.

19.4.6. Запись масс-спектров

Перметилированный ацетилпептид растворяют в капле хлороформа и раствор тщательно переносят в испаритель, укрепленный на металлическом штоке, который служит для введения пробы в ионный источник масс-спектрометра. Хлороформ отгоняют из испарителя, продувая через раствор воздух, который поступает из оттянутого конца пастеровской пипетки. После испарения хлороформа испаритель посредством штока вводится в ионный источник, в котором происходит испарение исследуемого вещества. Наилучшие результаты достигаются, когда испаритель не имеет специального нагревательного элемента, а подогревается за счет тепла, излучаемого нагретыми стенками ионизационной камеры. Использование испарителя с автономным обогревом при анализе смесей оказывается малоэффективным. Поддерживая температуру ионизационной камеры ~100 °C, испаряют из анализируемого образца такие легколетучие примеси, как диметилсульфоксид или углеводороды. Если при этом давление в области ионизационной камеры повышается, то шток на время выдвигают, ждут пока давление понизится до нужного уровня и снова вводят образец. После испарения всех легколетучих примесей, начинают испарять исследуемое вещество. Делают это следующим образом. Выдвинув испаритель из ионизационной камеры, включают устройство, повышающее ее температуру, и с равномерной скоростью повышают температуру ионизационной камеры до 350 °C. После нагревания ионизационной камеры на каждые 30 °C вводят испаритель и несколько раз записывают масс-спектр в диапазоне массовых чисел от m/z 1000 до m/z 90.

19.5. Общие принципы масс-спектрометрического определения аминокислотной последовательности пептидов и белков

Главное достоинство масс-спектрометрического определения аминокислотной последовательности заключается в возможности анализа смесей пептидов [24, 25], в противном случае масс-спектрометрия не могла бы конкурировать с классическими ме-

тодами установления первичной структуры пептидов и белков, потому что ее использование обходится намного дороже, чем применение ручного дансил-эдмановского метода анализа, чувствительность которого порой оказывается более высокой. Химикам-белковикам хорошо известно, что процесс выделения индивидуальных пептидов из смеси, образующейся при ферментативном расщеплении белков, является именно той стадией, которая лимитирует скорость определения аминокислотной последовательности пептидов классическими методами. Несмотря на то что первичная структура крупных пептидов в настоящее время обычно устанавливается автоматически с применением секвенаторов, для нахождения мест встраивания этих фрагментов в белковую цепь всегда приходится подвергать молекулу белка более глубокому неспецифическому расщеплению с образованием многих небольших пептидов. Для того чтобы установить аминокислотную последовательность этих коротких пептидов ручным способом, необходимо предварительно разделить смесь на индивидуальные компоненты. При определении структуры этих пептидов методом масс-спектрометрии необходимость выделения отдельных компонентов отпадает вовсе, а в случае сложных смесей достаточно грубого разделения смеси на отдельные фракции.

Исследуемую фракцию после модификации описанным выше способом помещают в испаритель и посредством штока вводят в ионный источник. Благодаря различной летучести модифицированных пептидов при плавном нагревании из смеси дробно возгоняются индивидуальные компоненты, и поэтому масс-спектры, которые записываются в определенные промежутки времени, обычно характеризуют те пептиды, содержание которых в газовой фазе является преимущественным. Сравнивая масс-спектры образца, получаемые при различных температурах, удается однозначно определять аминокислотную последовательность индивидуальных пептидов смеси. Такой подход дает хорошие результаты при анализе смесей, содержащих до пяти различных пептидов. Ниже будут обсуждены общие приемы установления первичной структуры белков, которые позволят наиболее эффективно использовать преимущества масс-спектрометрии при установлении аминокислотной последовательности коротких пептидов. При этом следует помнить, что для достижения максимального эффекта при установлении первичной структуры неизвестного белка всегда следует комбинировать классические и масс-спектрометрический методы. Такой подход может выглядеть следующим образом:

1) N-концевая аминокислотная последовательность белка или крупных пептидов определяется с помощью автоматических секвенаторов;

2) пептиды, образующиеся в результате специфического ферментативного расщепления белка трипсином или химотрипсином, структурно анализируются ручным дансил-эдмановским методом;

3) аминокислотная последовательность коротких пептидов, образующихся при неспецифическом расщеплении молекулы белка эластазой или субтилизином с целью установления мест встраивания крупных пептидов в белковую цепь, определяется масс-спектрометрически при анализе их смесей [2, 4, 25].

В ряде случаев как метод решения структурных задач следует предпочесть масс-спектрометрию. Например, для определения нуклеотидной последовательности участка ДНК, соответствующего определенному гену, потребуется затратить несравненно меньше усилий, если каким-либо методом определена частичная аминокислотная последовательность белка, первичную структуру которого он кодирует. Такая информация может быть получена в течение нескольких недель с использованием масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия — идеальный метод быстрой оценки степени гомологичности родственных белков [4]. Кроме того, масс-спектрометрия — это и непревзойденный метод структурного анализа амидов и определения положения остатков триптофана в пептидной цепи. План эксперимента при определении аминокислотной последовательности с применением масс-спектрометрии можно описать следующим образом:

1) белок неспецифически расщепляется эластазой или субтилизином. Глубина гидролиза проверяется аналитическим электрофорезом при pH 6,5;

2) основная масса коротких пептидов отделяется от негидролизованного белка и крупных пептидов гель-фильтрацией;

3) смесь коротких пептидов разделяется колоночной хроматографией на катионитах, например на дауэксе [4, 25], или высокоэффективной жидкостной хроматографией. Наилучшее разделение на катионитах достигается при элюировании смесью пиридина с уксусной кислотой [4, 25], а при высокоэффективной жидкостной хроматографии — смесью уксусной кислоты с пропанолом [26]. Присутствие пептидов в элюенте устанавливается аналитическим электрофорезом (для анализа используется $\sim 1/100$ каждой фракции);

4) в результате отбора определенных фракций и их высушивания готовятся пробы, содержащие в смеси до пяти пептидов;

5) пробы химически модифицируются и анализируются методом масс-спектрометрии.

Применение такого подхода позволяет опытному исследователю примерно в течение двух месяцев получить 70% информации о аминокислотной последовательности белка с $M \leqslant 20\,000$.

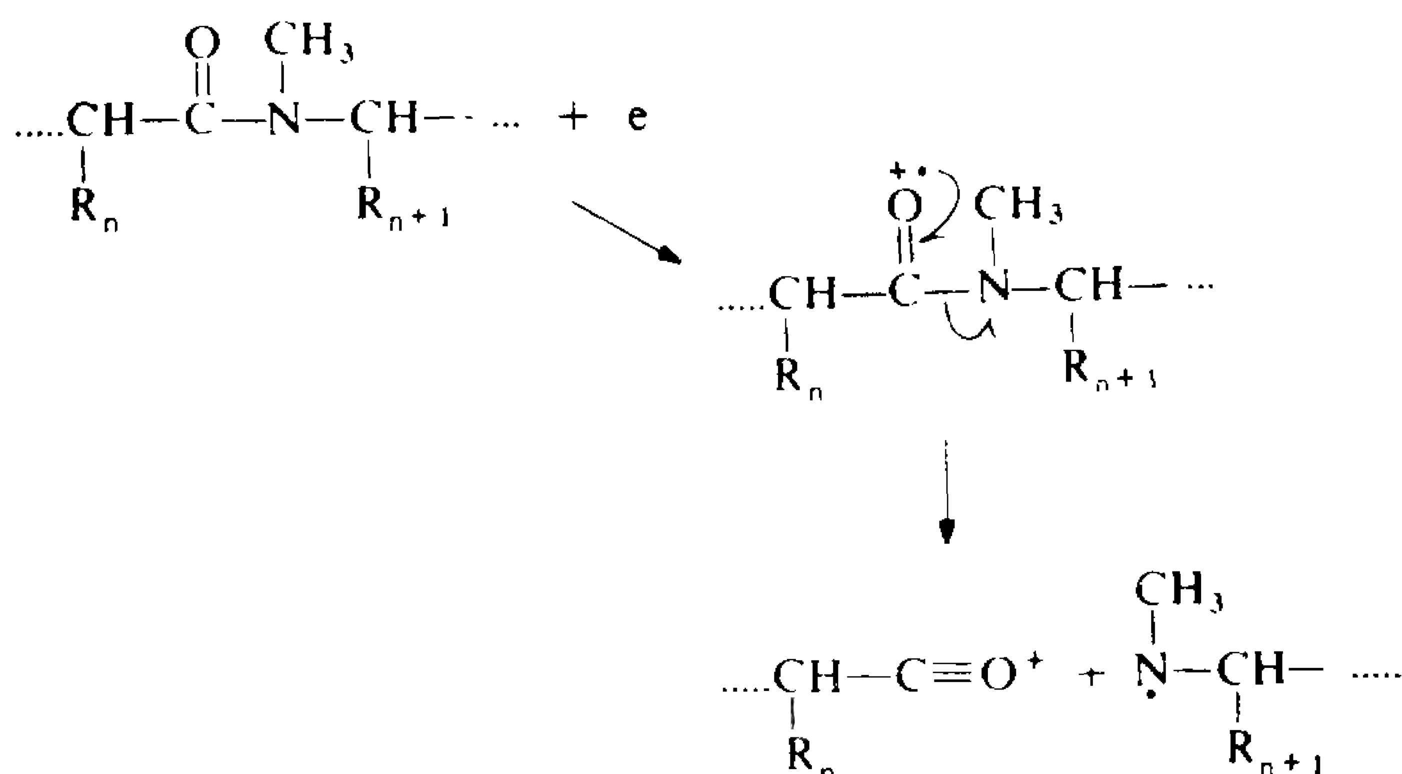


РИС. 19.3. C—N-Разрыв пептидных связей в перметилированных пептидах.

19.6. Интерпретация масс-спектров

19.6.1. Введение

Однозначное установление аминокислотной последовательности пептида путем расшифровки сложного масс-спектра требует определенного опыта, который приобретается лишь в результате длительного предварительного изучения спектров большого количества пептидов известного строения. В этом разделе делается попытка изложить принцип интерпретации масс-спектров и в связи с этим коротко излагаются основные пути фрагментации пептидов при электронном ударе. Более подробно с установлением аминокислотной последовательности пептидов методом масс-спектрометрии можно ознакомиться в ряде ранее опубликованных работ [1, 3, 6—10, 24, 27, 28].

19.6.2. Пути фрагментации пептидов

1. Фрагментация перметилированных ацетилпептидов при электронном ударе обусловлена в основном разрывом амидных связей, т. е. связей C—N (рис. 19.3). Образующиеся в результате разрыва этих связей ионы как раз и характеризуют аминокислотную последовательность пептида. Разность масс таких ионов отвечает величинам, характеризующим массы аминокислотных остатков. Сначала находят в масс-спектре ион, характеризующий остаток N-концевой аминокислоты, массовое число m/z которого обычно лежит в интервале 114—257, а затем прибавляют к этому массовому числу массовые числа аминокислотных остатков, которые могут входить в состав пептида, и находят в спектре ионы больших массовых чисел, которые определяют аминокис-

Таблица 19.1. Массы N-концевых ионов и их аминокислотных остатков в пептидной цепи в масс-спектрах электронного удара ацетилированных перметилпептидов

Аминокислота	Масса N-концевого иона	Масса аминокислотного остатка	Аминокислота	Масса N-концевого иона	Масса аминокислотного остатка
Gly	114	71	Met	188	145
Ala	128	85	Asn	199	156
Pro	140	97	Glu	200	157
Val	156	113	Phe	204	161
Ser	158	115	His	208	165
Leu	170	127	Gln	213	170
Thr	172	129	Orn	227	184
Cys	174	131	Tyr	234	191
Asp	186	143	Lys	241	198
			Trp	257	214

лотную последовательность исследуемого образца. В качестве примера рассмотрим пептид A-B-C-D, где A, B, C и D — остатки модифицированных аминокислот. При электронном ударе этот пептид образует ионы A^+, AB^+, ABC^+ и $ABCD^+$. Возможные массовые числа N-концевых ионов, которые обычно образуются при фрагментации пептидов, приведены в табл. 19.1. Следует помнить, что при масс-спектрометрическом определении первичной структуры пептидов не удается различать между собой остатки лейцина и изолейцина.

2. Остатки аминокислот, боковая цепь которых в общем виде может быть представлена как CH_2X, где заместитель X может содержать сопряженные связи, склонны к разрыву связей C—N, сопровождающемуся миграцией атома водорода (рис. 19.4). Такой распад характерен для пептидов, построенных из остатков аспарагиновой кислоты, аспарагина, фенилаланина, гистидина, тирозина и триптофана. Заметим, что при такой фрагментации образуются новые пептиды, аминокислотная последовательность которых начинается с остатка той кислоты, которая подверглась разрыву связей C—N, и пики ионов, характеризующих их аминокислотную последовательность, будут присутствовать в масс-спектре. Массы N-концевых ионов пептидов,

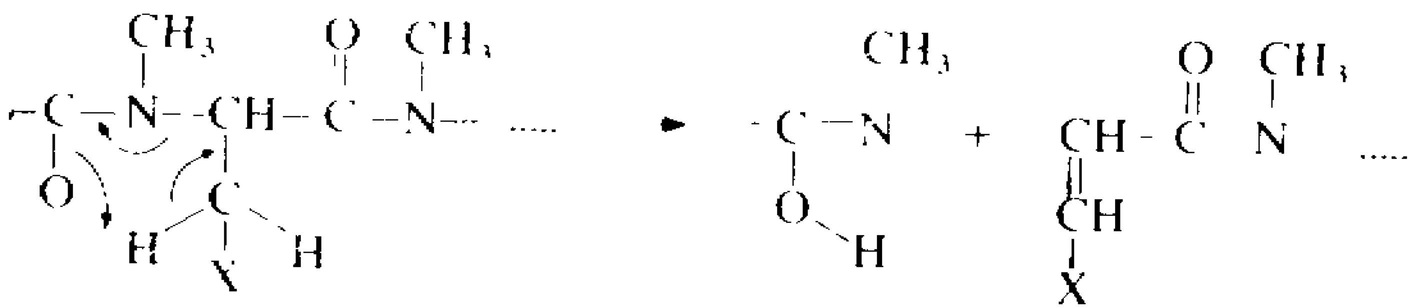


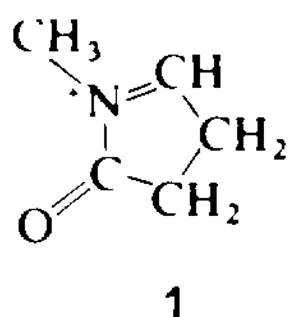
РИС. 19.4. N—C-Разрыв пептидных связей в перметилированных пептидах с перегруппировкой атомов водорода.

Таблица 19.2. Массы N-концевых ионов, образующихся в результате разрыва связей С—N

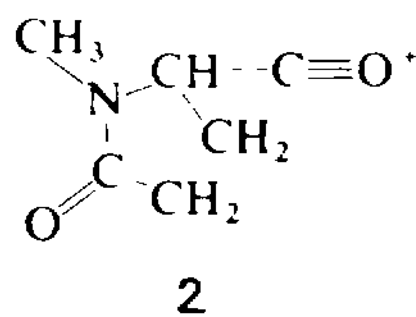
Ион	Масса	Ион	Масса
...Asp	113	...His	135
...Asn	126	...Tyr	161
...Phe	131	...Trp	184

образующихся в результате разрыва связей С—N, приведены в табл. 19.2.

3. Остатки глутаминовой кислоты и глутамина, независимо от положения в цепи, обычно частично циклизуются, образуя ионы N-концевой пирролидонкарбоновой кислоты. Такая циклизация приводит к появлению в спектре иона **1** с *m/z* 98, а соответствующий ему N-концевой ион **2** с *m/z* 126 характеризуется пиком малой интенсивности или вовсе отсутствует.



1



2

4. Распад боковых цепей некоторых аминокислотных остатков часто облегчает интерпретацию масс-спектров пептидов. Таковы, например, остатки серина и треонина, боковые цепи которых склонны к элиминированию молекул метанола. Кроме того, для остатка треонина характерен отрыв всей боковой цепи в результате разрыва С—С-связи с миграцией Н или без таковой. Аналогично ведет себя метионин, остаток которого теряет молекулу CH_3SH (*M* 48) и/или всю боковую цепь.

19.6.3. Введение ^{2}H-метки

Для повышения надежности определения аминокислотной последовательности пептиды модифицируют, применяя $^2H_6$-уксусный ангидрид или $^2H_3$-метилиодид вместо обычных реагентов. Анализ масс-спектров этих производных приводит к более достоверным результатам. Рассмотрим следующий пример, иллюстрирующий высказанное выше. Ион с *m/z* 126 в масс-спектре перметилированного ацетилпептида может принадлежать остатку N-концевой пирролидонкарбоновой кислоты, остатку аспарагина, образовавшемуся в результате N—С-разрыва или N-концевому остатку серина, который потерял молекулу метанола. Анализ масс-спектров ^{2}H-меченых производных позволяет одно-

значно установить природу данного иона. Если использовать для химической модификации данного пептида немеченый метилиодид и $^{2}H_6$-уксусный ангидрид, то в первых двух случаях масса рассматриваемого иона не изменится, а в третьем случае вместо иона с m/z 126 образуется ион с m/z 129. Если модифицировать пептид $^{2}H_3$-метилиодидом и немеченым уксусным ангидридом, то в первых двух случаях должен образоваться ион с m/z 129, а в третьем случае — с m/z 132.

19.7. Особые случаи применения метода

19.7.1. Пептиды с защищенной N-концевой аминогруппой

Аминокислотная последовательность пептидов, не содержащих свободной α-аминогруппы, не может быть установлена классическими методами, но достаточно просто определяется масс-спектрометрически [8, 10—14]. Если предполагается, что имеется N-концевая защитная группа, химическую модификацию проводят обычным способом, но для ацетилирования применяют $^{2}H_6$-уксусный ангидрид. В этих условиях присоединение $^{2}H_3$-ацетильной группы к N-концевой аминогруппе пептида возможно лишь при наличии ее в свободном виде. В случае неизвестной защитной группировки, ее массу определяют из массового числа N-концевого иона.

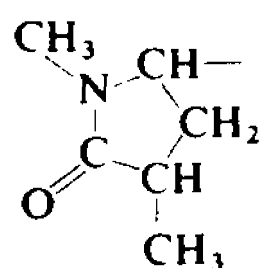
19.7.2. Определение N-концевой аминокислотной последовательности

Обычно для определения N-концевой аминокислотной последовательности белка используют секвенатор. Однако в ряде случаев, например, когда N-конец белка заблокирован или когда необходимо определить N-концевую последовательность одновременно нескольких белковых субъединиц, нужная информация более успешно получается масс-спектрометрически. Для этого 50—100 нмоль белка растворяют в 200 мкл 98%-ной муравьиной кислоты и добавляют 100 мкл уксусного ангидрида. После 30 мин стояния при комнатной температуре раствор упаривают при пониженном давлении. Формилированный таким образом белок растворяют далее в 20 мМ растворе NH_4HCO_3 с pH 8,5 и гидролизуют химотрипсином или эластазой. Гидролизат лиофилизуют и перметилируют. При перметилировании пептиды со свободными N-концевыми аминогруппами образуют соответствующие четвертичные аммониевые соли, которые легко удаляются из реакционной смеси при промывании ее водой. После такого промывания в реакционной массе остается лишь пептид, формилированный по N-концевой аминогруппе. Описан-

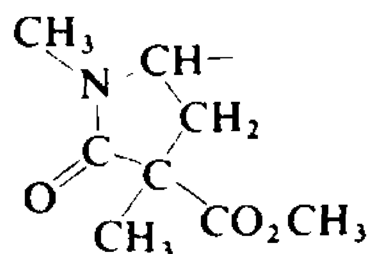
ным выше способом получают масс-спектр, на основании которого устанавливают аминокислотную последовательность N-концевого пептида. Ясно, что для успешного применения описанного метода необходимо, чтобы на определенном расстоянии от N-концевого аминокислотного остатка в белке имелись пептидные связи, расщепляемые указанными ферментами с образованием пептидов, изучение которых возможно методом масс-спектрометрии.

19.7.3. Белки, содержащие остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты

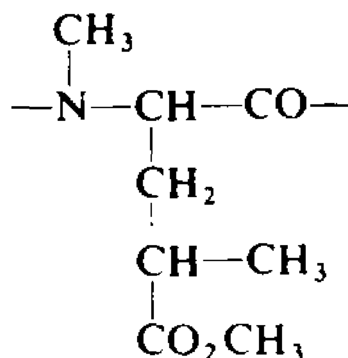
Масс-спектрометрический метод позволяет однозначно идентифицировать остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты в пептидной цепи [9, 29]. Для этого пептиды ацетилируют и перметили-



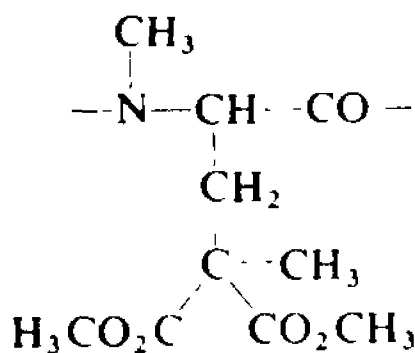
3



4



5



6

руют обычным способом (разд. 19.4.4 и 19.4.5) и модифицированную смесь анализируют методом масс-спектрометрии. Наличие N-концевого остатка γ-карбоксиглутаминовой кислоты в пептиде устанавливается по наличию в его масс-спектре пиков ионов **3** и **4** с m/z 112 и 170. Присутствие в спектрах пиков ионов **5** и **6** с m/z 171 и 229 а. е. м., указывает на наличие остатка γ-карбоксиглутаминовой кислоты в пептидной цепи.

19.8. Заключение

Определение аминокислотной последовательности пептидов в смеси методом масс-спектрометрии электронного удара стало в настоящее время обычным исследованием. Химики-белковики, имеющие в своем распоряжении необходимые приборы и вла-

деющие приемами интерпретации масс-спектров, успешно применяют масс-спектрометрию в дополнение к другим методам определения аминокислотной последовательности.

Применение масс-спектрометрии особенно плодотворно при анализе трудно разделяемых пептидов, пептидов со свободными амидными группировками, а также при определении первичной структуры триптофансодержащих соединений. Масс-спектрометрия как метод определения аминокислотной последовательности просто незаменима в случае пептидов с блокированными N-концами или пептидов, построенных из остатков необычных аминокислот.

В последние годы для исследования труднолетучих, полярных и термически неустойчивых соединений стала использоваться масс-спектрометрия с новым методом ионизации — ионизацией в результате бомбардировки помещенного в глицерин вещества ускоренными атомами инертных газов [30]. Масс-спектрометрия с бомбардировкой ускоренными атомами стала использоваться для определения аминокислотной последовательности немодифицированных пептидов. Указывается, что в наиболее благоприятных условиях для этого достаточно 15 **пмоль пептида.** Познакомиться более подробно с этим новым методом исследования можно в ряде специальных статей [31—34].

Литература

1. *Morris H. R., Williams D. H., Midwinter G. G., Hartley B. S.*, Biochem. J., **141**, 701—713 (1974).
2. *Shaw W. V., Packman L. C., Burleigh B. D., Dell A., Morris H. R., Hartley B. S.*, Nature (Lond.), **282**, 870—872 (1979).
3. *Dell A., Morris H. R.*, Biomed. Mass Spectrom., **8**, 128—136 (1981).
4. *Dell A., Morris H. R.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **78**, 847—880 (1977).
5. *Batley K. E., Morris R. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **4**, 1010—1014 (1977).
6. *Morris H. R.*, Phil. Trans. Roy. Soc. London A, **293**, 39—51 (1979).
7. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L., Morgan B. A., Morris H. R.*, Nature (Lond.), **258**, 577—599 (1975).
8. *Morris H. R., Dell A.*, Biochem. J., **149**, 754 (1975).
9. *Morris H. R., Dell A., Petersen T. E., Sottrup-Jensen L., Magnusson S.*, Biochem. J., **153**, 663—679 (1976).
10. *Stone J. V., Mordue W., Batley K. E., Morris H. R.*, Nature (Lond.), **263**, 207—211 (1976).
11. *Hofmann T., Kawakami M., Hitchman A. J. W., Harrison J. E., Dorrington K. J.*, Can. J. Biochem., **5**, 737—748 (1979).
12. *Nystrom L.-E., Lindberg V., Kendrick-Jones J., Jakes R.*, FEBS Lett., **101**, 161—165 (1979).
13. *Fitton J. E., Dell A., Shaw W. V.*, FEBS Lett., **115**, 209—215 (1980).
14. *Vinson G. P., Whitehouse B. J., Dell A., Etienne A. T., Morris H. R.*, Nature (Lond.), **284**, 464—467 (1980).
15. *McDonagh R. P., McDonagh J., Petersen T. E., Thorgersen H. C., Skorstengaard K., Sottrup-Jensen L., Magnusson S., Dell A., Morris H. R.*, FEBS Lett., **127**, 174—178 (1981).

16. *Das B. C., Gero S. D., Lederer E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 211—213 (1967).
17. *Lederer E.*, Pure Appl. Chem., **17**, 489—517 (1968).
18. *Vilkas E., Lederer E.*, Tetrahedron Lett., **26**, 3089—3092 (1968).
19. *Aplin R. T., Eland I., Jones J. H.*, Org. Mass Spectrom., **2**, 795—799 (1969).
20. *Morris H. R., Geddes A. J., Graham G. N.*, Biochem. J., **111**, 38 (1969).
21. *Morris H. R.*, FEBS Lett., **22**, 257—260 (1972).
22. *Morris H. R., Dickinson R. J., Williams D. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **51**, 247—255 (1973).
23. *Yamada S., Itano H. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **130**, 538—540 (1966).
24. *Morris H. R., Williams D. H., Ambler R. P.*, Biochem. J., **125**, 189—201 (1971).
25. *Morris H. R., Batley K. E., Harding N. G. L., Bjur R. A., Dann J. G., King R. W.*, Biochem. J., **137**, 409—411 (1974).
26. *Morris H. R., Etienne A. T., Dell A., Albuquerque R.*, J. Neurochem., **34**, 574—582 (1980).
27. *Dell A., Morris H. R.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **61**, 1125—1132 (1974).
28. *Morris H. R., Dell A.*, In: Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis/ Perham R. N. (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco, pp. 147—191 (1975).
29. *Thorgersen H. C., Petersen T. E., Sottrup-Jensen L., Magnusson S., Morris H. R.*, Biochem. J., **175**, 613—627 (1978).
30. *Barber M., Bordoli R. S., Sedgwick R. D., Tyler A. N.*, Nature (Lond.), **293**, 270—273 (1981).
31. *Morris H. R., Panico M., Barber M., Bordoli R. S., Sedgwick R. D., Tyler A. N.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **101**, 623—631 (1981).
32. *Rinehart K. L. Jr., Guadioso L. A., Moore M. L., Pandey R. C., Cook J. C. Jr., Barber M., Sedgwick R. D., Bordoli R. S., Tyler A. N., Green B. N.*, J. Am. Chem. Soc., **103**, 6517—6520 (1981).
33. *Morris H. R., Dell A., Etienne A. T., Judkins M., McDowell R. A., Panico M., Taylor G. W.*, Pure Appl. Chem., **54**, 267—279 (1982).
34. *Williams D. H., Bradley C. V., Santikarn S., Bojesen G.*, Biochem. J., **201**, 105—117 (1982).

Глава 20

РЕНТГЕНОВСКАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Д. ДОВЕР (D. DOVER, *Department of Biophysics, King's College, London, Strand, London WC2R 2LS, U.K.*)

20.1. Дифракция рентгеновских лучей

20.1.1. Введение

Окончательный результат, к которому стремится исследователь-биохимик, состоит в выявлении динамической трехмерной структуры молекулы изучаемого соединения, отражающей все конформационные изменения, происходящие в процессе ее функционирования. Единственный метод, который сегодня дает детальную информацию о пространственной организации белковых молекул, это рентгеноструктурный анализ. Однако и он позволяет установить в лучшем случае лишь ограниченное число конформационных состояний сложного химического соединения. С помощью других физических методов можно оценить, например, форму, размеры, асимметричность молекулы или наоборот детально исследовать строение только небольшой части макромолекулы. В отличие от этих методов электронная микроскопия позволяет получать трехмерное изображение белковых молекул, хотя уровень разрешения деталей их структуры значительно хуже, чем в случае рентгеноструктурного анализа.

20.1.2. Получение изображений молекул — разновидность структурного анализа

При рассмотрении образца в обычном световом микроскопе рассеянный объектом свет фокусируется объективом, благодаря чему формируется увеличенное изображение (рис. 20.1). При рассеянии от образца световых волн они претерпевают фазовые изменения, и линзы объектива, фокусируя их, сохраняют полученное после рассеяния соотношение фаз. Благодаря этому при рекомбинации лучей формируется изображение объекта (рис. 20.2). Разрешение, т. е. минимальный размер деталей, воспроизводимых в таком изображении, ограничен длиной волны используемого света (обычно ~600 нм). Более мелкие де-

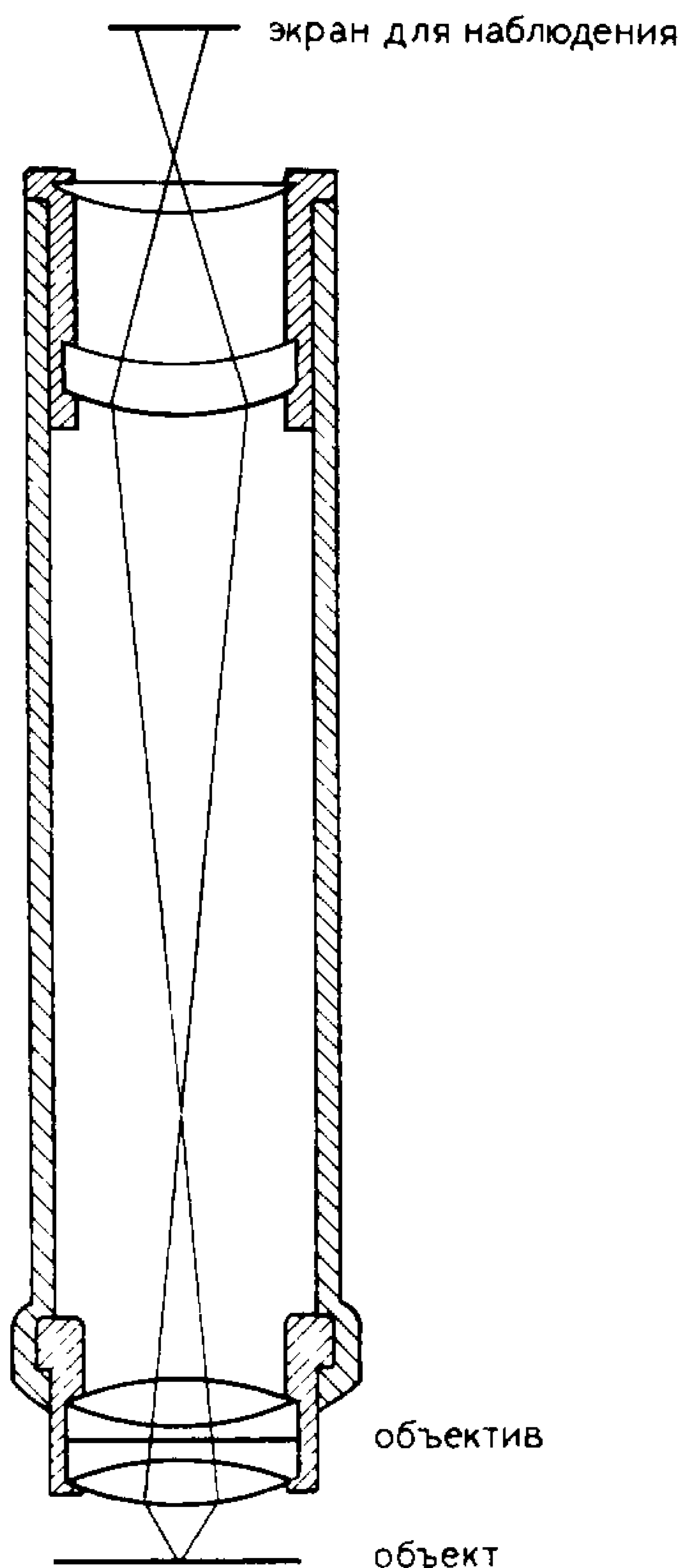


РИС. 20.1. Схема светового микроскопа со стеклянными линзами, собирающими рассеянный образцом свет и реконструирующими увеличенное изображение объекта. Такая конструкция позволяет сохранить фазы рассеянных лучей в их исходном соотношении.

тали могли бы быть видны в микроскоп, работающий, например на рентгеновском излучении с длиной волны 0,154 нм (CuK_α-линия). К сожалению, линзы, способные фокусировать рентгеновские лучи, еще не созданы, и поэтому получить изображение в таких условиях нельзя. Можно лишь зарегистрировать интенсивности лучей, рассеянных изучаемым объектом, например, с помощью фотопластинки. Однако фазы этих лучей остаются неизвестными, и поэтому невозможно реконструировать изображение объекта.

Объект, который до сих пор рассматривался, мог состоять из многих молекул, находящихся в различных ориентациях, например состояние молекул белка в растворе. Изображение такого образца воспроизвело бы каждую из молекул в ее конкретной ориентации. Собирая, однако, данные только об интенсивностях лучей, невозможно выделить лучи, рассеянные той или иной молекулой или окружающими их молекулами растворителя. Это можно сделать, используя кристаллические образцы, где все молекулы находятся в одинаковой ориентации (рис. 20.3). Благодаря регулярности кристалла лучи, рассеянные этими молекулами, концентрируются в отдельные дифракционные пики, что позволяет отделить излучение, рассеянное белковыми молекулами от фонового рассеивания, обусловленного, например, молекулами растворителя, и тем самым значительно повысить величину отношения полезного сигнала к шуму. Исследование кристаллических образцов может дать лишь усредненное изображение молекулы исследуемого вещества в кристаллической решетке, а не индивидуальное изображение какой-то конкретной

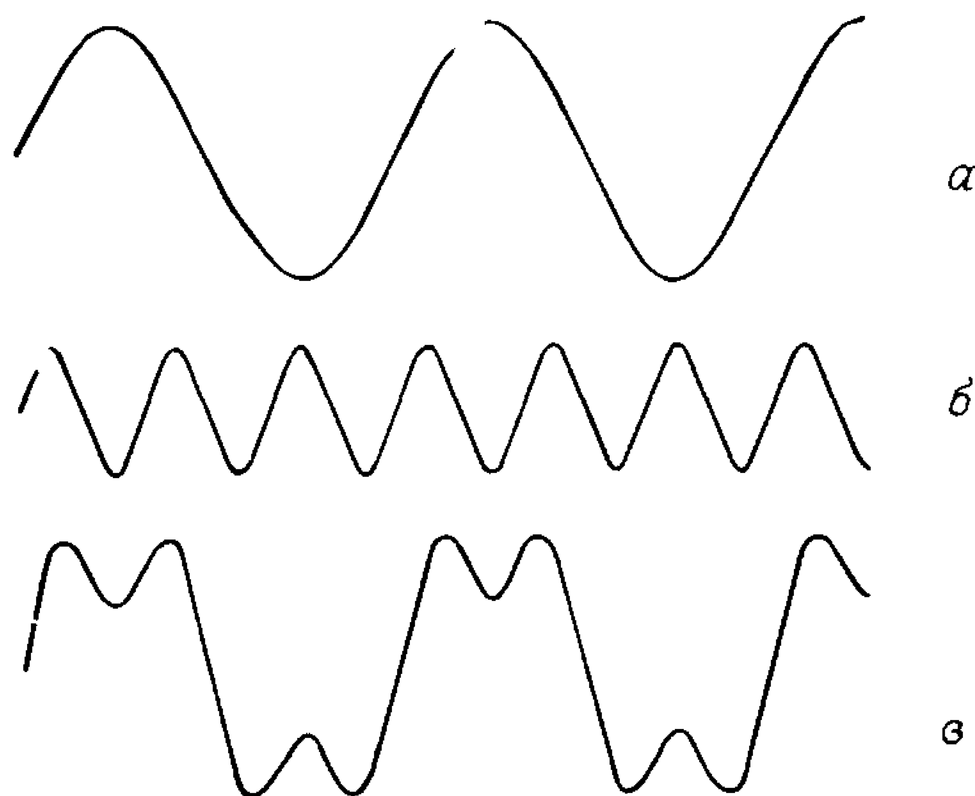


РИС. 20.2. Две световые волны (*а* и *б*) с разными амплитудами и фазами и их сумма (*в*). Видно, что и амплитудная, и фазовая информации необходимы для суммирования.

молекулы, свободно плавающей в растворе. Дифракционная картина от кристалла (см., например, рис. 20.4) может быть зарегистрирована с помощью рентгеновской камеры подходящей конструкции. Дифракционная картина отражает трехмерное строение изучаемого кристалла. Поэтому полный набор данных об интенсивностях рассеянных лучей должен включить серию таких дифракционных картин, расположенных одна над другой и образующих так называемую обратную трехмерную дифракционную решетку. Расстояния между узлами такой решетки обратно пропорционально расстояниям между молекулами в кристалле. Интенсивности дифракционных максимумов, или пятен, содержат информацию о тонкой структуре молекулы. И если бы удалось определить относительные величины фаз волн в момент пересечения ими фотопластинки, то можно было бы рассчитать структуру молекулы и тем самым получить ее изображение. Однако определение фаз, или, как принято говорить, решение фазовой проблемы, является одной из наиболее трудоемких стадий рентгеноструктурного исследования.

20.1.3. Принципы определения структуры в рентгеноструктурном анализе

Прежде чем обсуждать теоретические и методические особенности рентгеновской кристаллографии, рассмотрим вопрос о том, какую информацию можно получить с помощью этого подхода. Рентгеноструктурный анализ хорошо сформированных кристал-

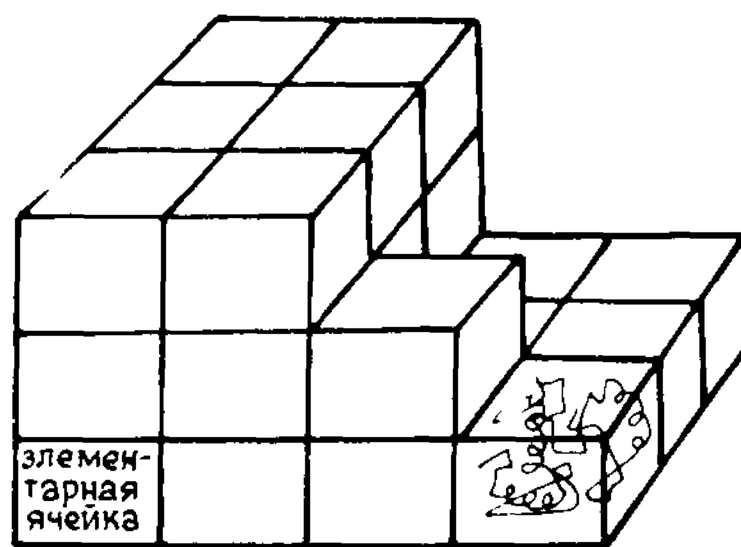


РИС. 20.3. Схематическое изображение кристалла, состоящего из регулярно упакованных элементарных ячеек. Все ячейки одинаковы, и каждая образована одной или несколькими молекулами. Регулярность упаковки обусловливает концентрирование рассеянных кристаллом лучей в дискретные интенсивные пики.

лов относительно малых молекул органических соединений дает возможность рассчитать распределение электронной плотности внутри элементарной ячейки кристалла. Это распределение, называемое также трехмерным фурье-синтезом, можно представить в виде серии двумерных «контурных» карт, соответствующих плоским сечениям элементарной ячейки. Интервалы, через которые делаются сечения, выбираются столь малыми, что образующие ячейку кристалла атомы видны как отдельные изолированные максимумы электронной плотности (рис. 20.5). Уровень разрешения таких карт, достигающий подчас 0,05 нм, позволяет определить структуру ab inito. Поэтому в ряде лабораторий органической химии использование рентгеновской кристаллографии для определения химической структуры соединений стало уже обычной практикой (см., например, [5]).

В случае крупных органических молекул, таких, как белки, карты электронной плотности имеют более низкое разрешение (обычно ~0,15 нм). Как видно из рис. 20.6, они не позволяют прямо разрешить отдельные атомы. В этих случаях для определения структуры необходимо привлекать дополнительную информацию, а именно схему расположения в молекуле ковалентных связей. Такая схема может быть сконструирована на основе установленной ранее последовательности аминокислот в полипептидной цепи и данных об их стереохимии.

На рис. 20.7 показано, как на основе такой информации, полученной при исследовании аминокислот, может быть построена конкретная модель остова и боковых группировок белковой молекулы, заполняющих карту электронной плотности элементарной ячейки кристалла.

20.1.4. Кристаллография белков

Любое кристаллографическое исследование в конечном итоге имеет целью получить экспериментальные данные о распределении электронной плотности $\rho(x, y, z)$, которую можно выразить с помощью функции Фурье:

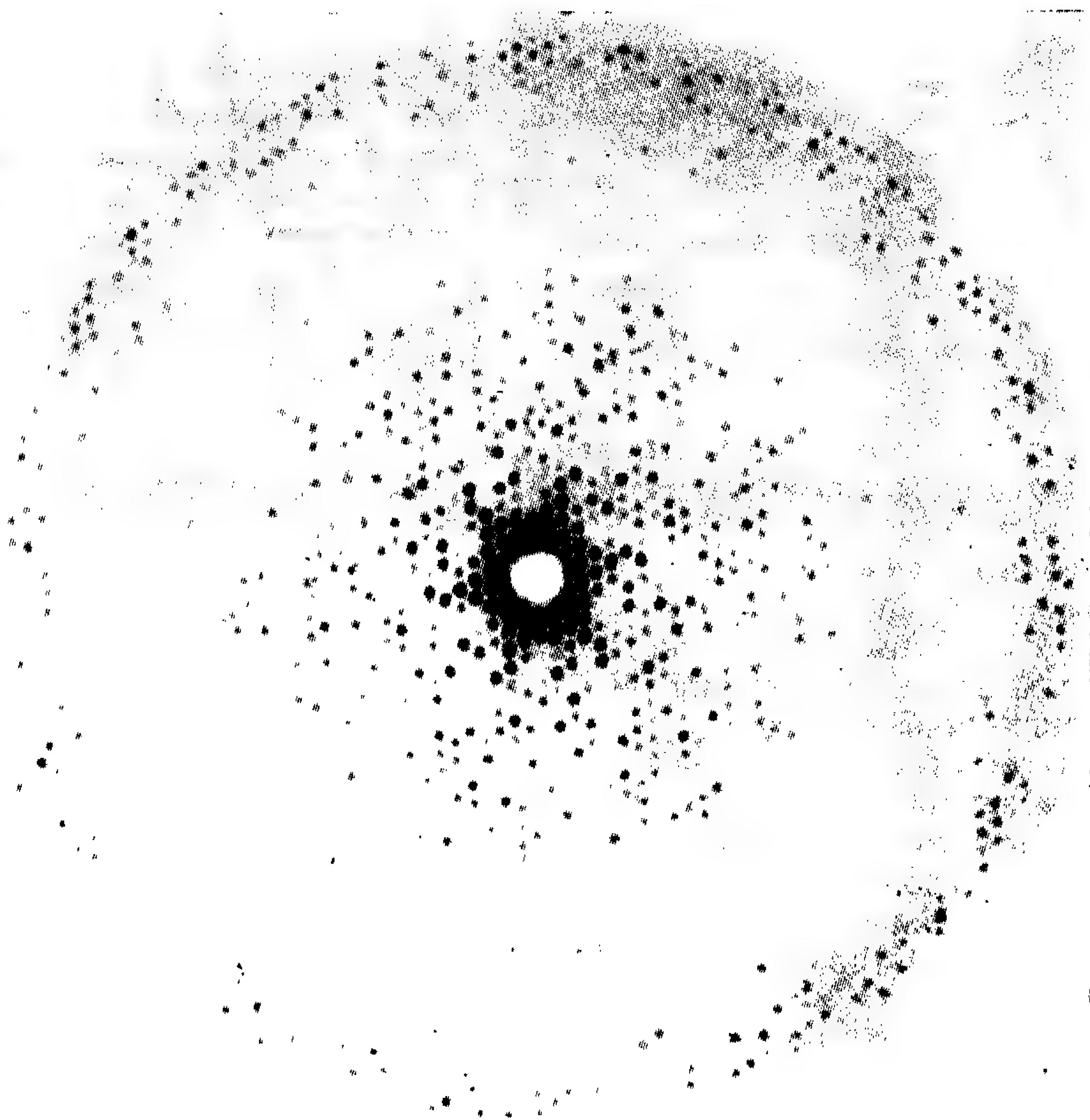


РИС. 20.4. Дифракционная картина, полученная с помощью прецессионной камеры, от кристалла С-фикоцианиа (имеется информация об амплитудах, но не фазах дифракционных максимумов).

$$\rho(x,\ y,\ z)=\sum_{hkl} A(hkl)\cos 2\pi(hx+ky+lz)+$$
$$+B(hkl)\sin 2\pi(hx+ky+lz)$$

Коэффициенты A и B связаны с интенсивностями $F^2(hkl)$ дифракционных пиков и их фазами φ:

$$A(hkl)=F^2(hkl)\cdot\cos\varphi$$
$$B(hkl)=F^2(hkl)\cdot\sin\varphi$$

Основное отличие белковой кристаллографии от кристаллографии малых молекул состоит в методах определения фаз. В случае малых молекул информация о фазах может быть по-

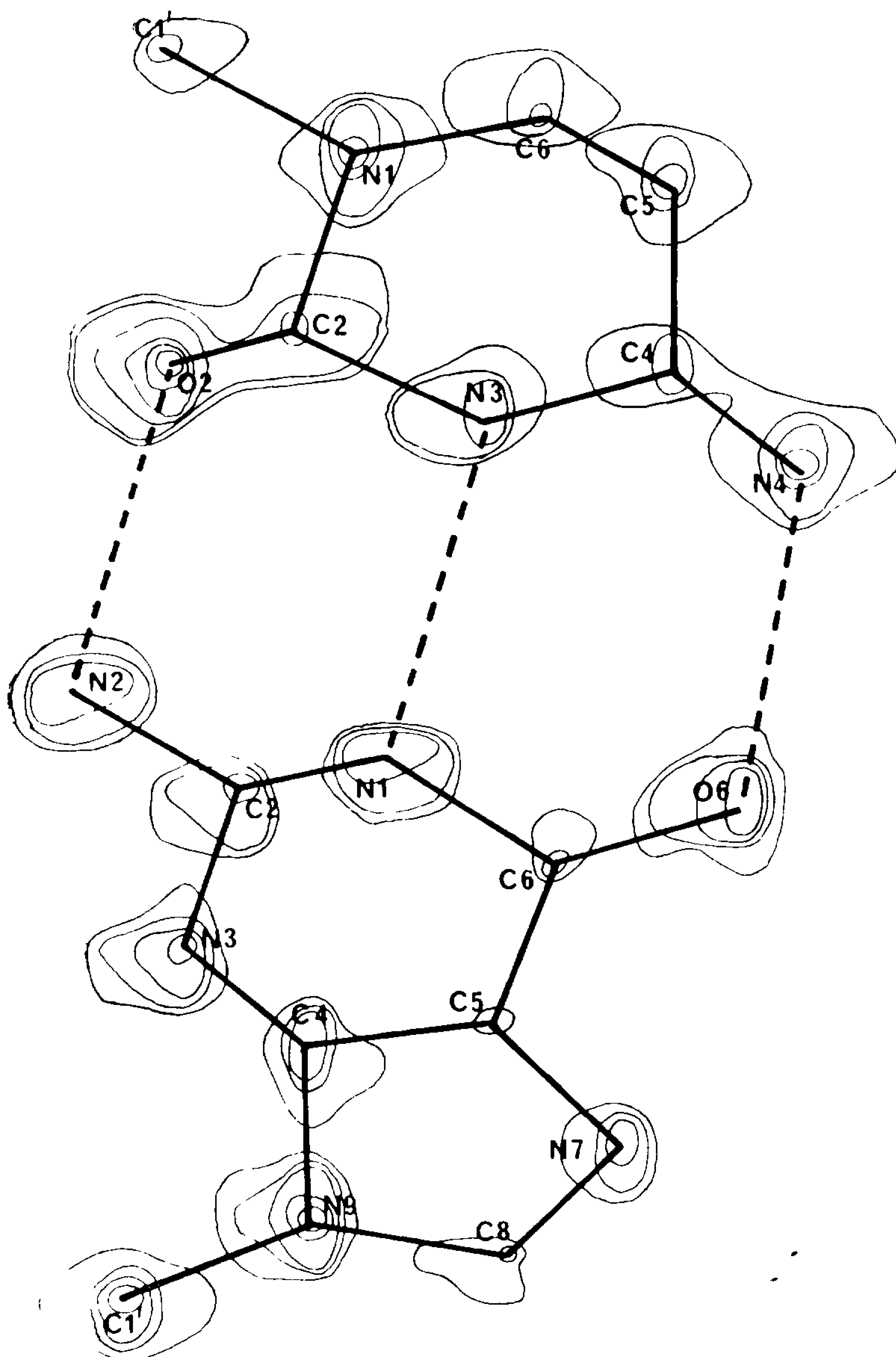


РИС. 20.5. Карта электронной плотности с наложенной на нее схемой структуры небольшой молекулы. Атомы на карте видны как дискретные максимумы электронной плотности.

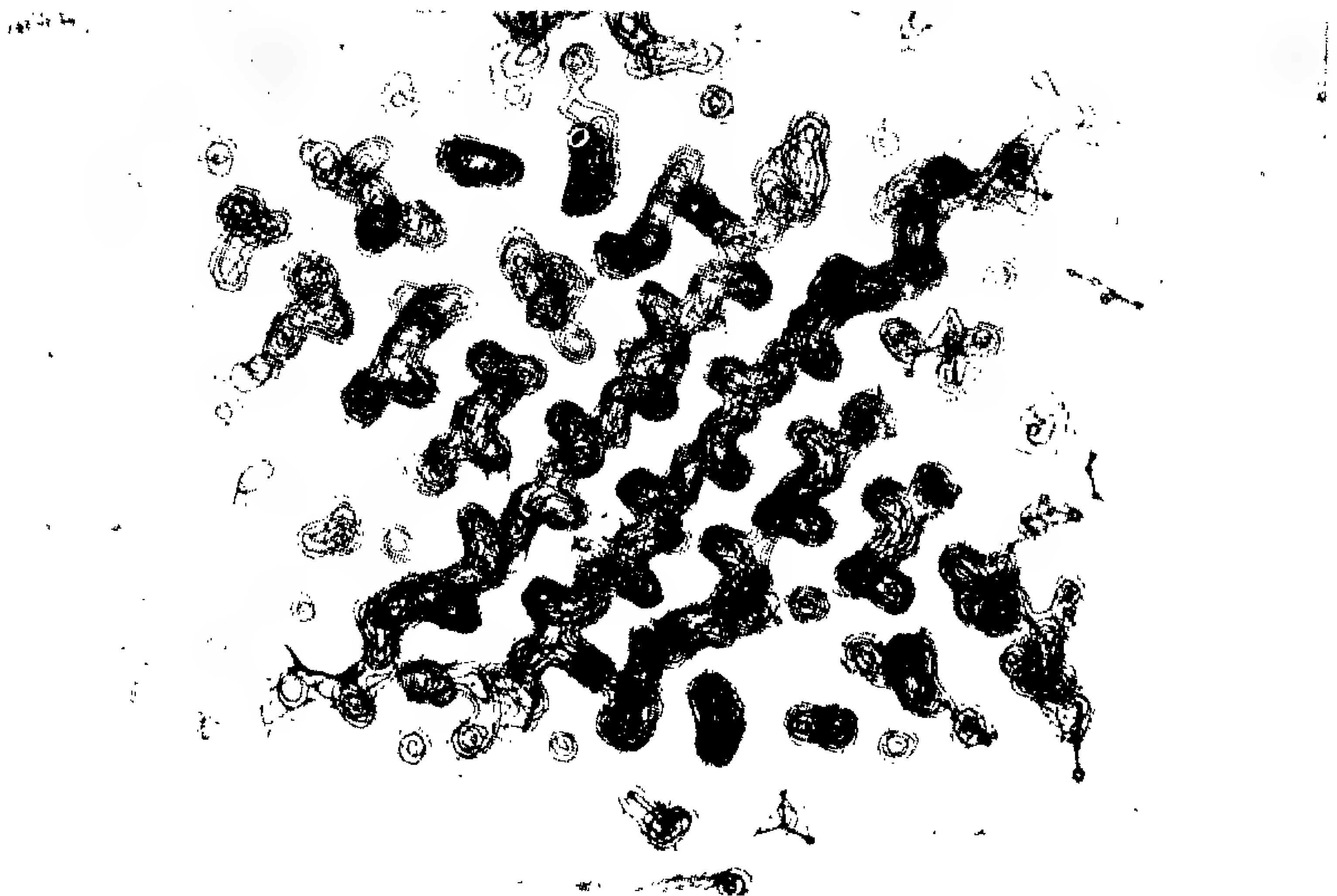


РИС. 20.6. Участок карты электронной плотности преальбумина. Отчетливо виден участок полипептидной цепи, образующий плоский β-лист, тогда как отдельные атомы не разрешаются.

лучена на основе статистического анализа данных по интенсивностям дифракционных пиков, полученных от кристалла. При изучении белков необходимо измерить интенсивности дифракционных пиков белкового кристалла, а также двух или большего числа кристаллов производных этого белка. Такие производные получают путем присоединения к белку атомов тяжелых металлов до или после кристаллизации. Кристалл производного должен отличаться от исходного кристалла только наличием тяжелых атомов, тогда как сам белок должен находиться в той же конформации, ориентации и упаковке, как и в нативном кристалле. В этом случае производное называют изоморфным.

Если получены нативный кристалл и подходящее число его изоморфных производных, то следующим этапом исследования является сбор данных об интенсивностях дифракционных пиков для всех этих кристаллов. Собранная информация об интенсивностях может быть обработана таким образом, чтобы определить положение тяжелых атомов в кристаллах производных. А это в свою очередь позволяет определить фазы для всех рефлексов нативного кристалла [1].

20.1.4.1. Стадии структурного анализа. Процесс определения структуры белка можно разделить на несколько стадий (рис. 20.8); на некоторых из них могут встретиться серьезные

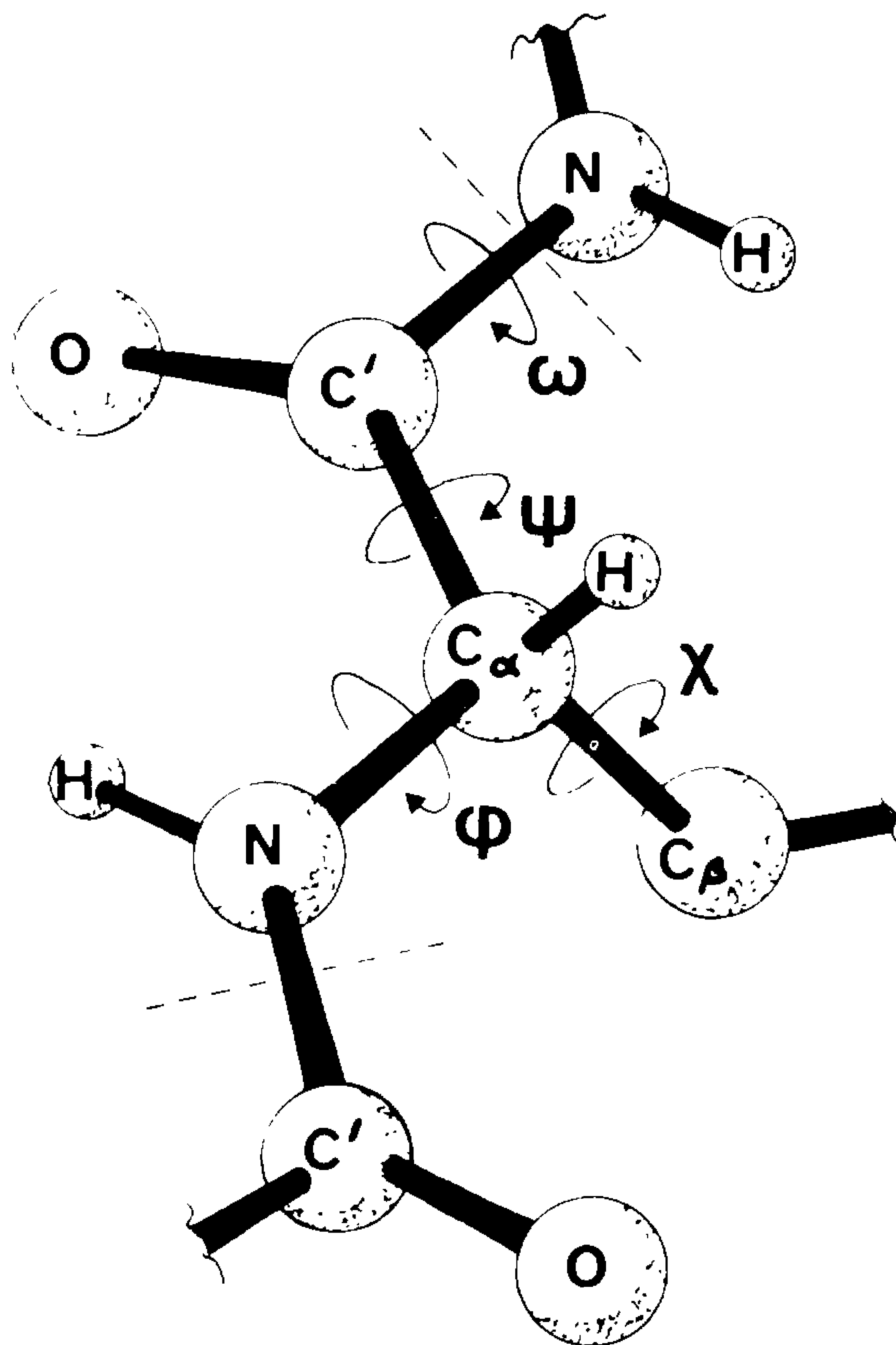


РИС. 20.7. Объемная схема участка полипептидного остова молекулы в виде цепи с фиксированной конформацией, которая была получена вращением отдельных звеньев вокруг химических связей фиксированной длины.

затруднения, и тогда надо вернуться вновь к более ранним этапам работы (в соответствии с тем, как показано на рисунке стрелками). На рисунке не отражен также этап работы, связанный с выделением и очисткой белка, где главная роль отводится специалисту-биохимику.

20.1.4.2. Получение кристаллов. Для получения рентгеновской дифракционной картины необходимы кристаллы, минимальный размер которых составляет несколько десятых долей миллиметра, т. е. значительно более крупные, чем образующиеся обычно при кристаллизации. Однако предварительная информация о том, что белок может быть получен в микрокристаллическом состоянии, чрезвычайно полезна для поиска условий и метода выращивания крупных кристаллов, пригодных для структурного

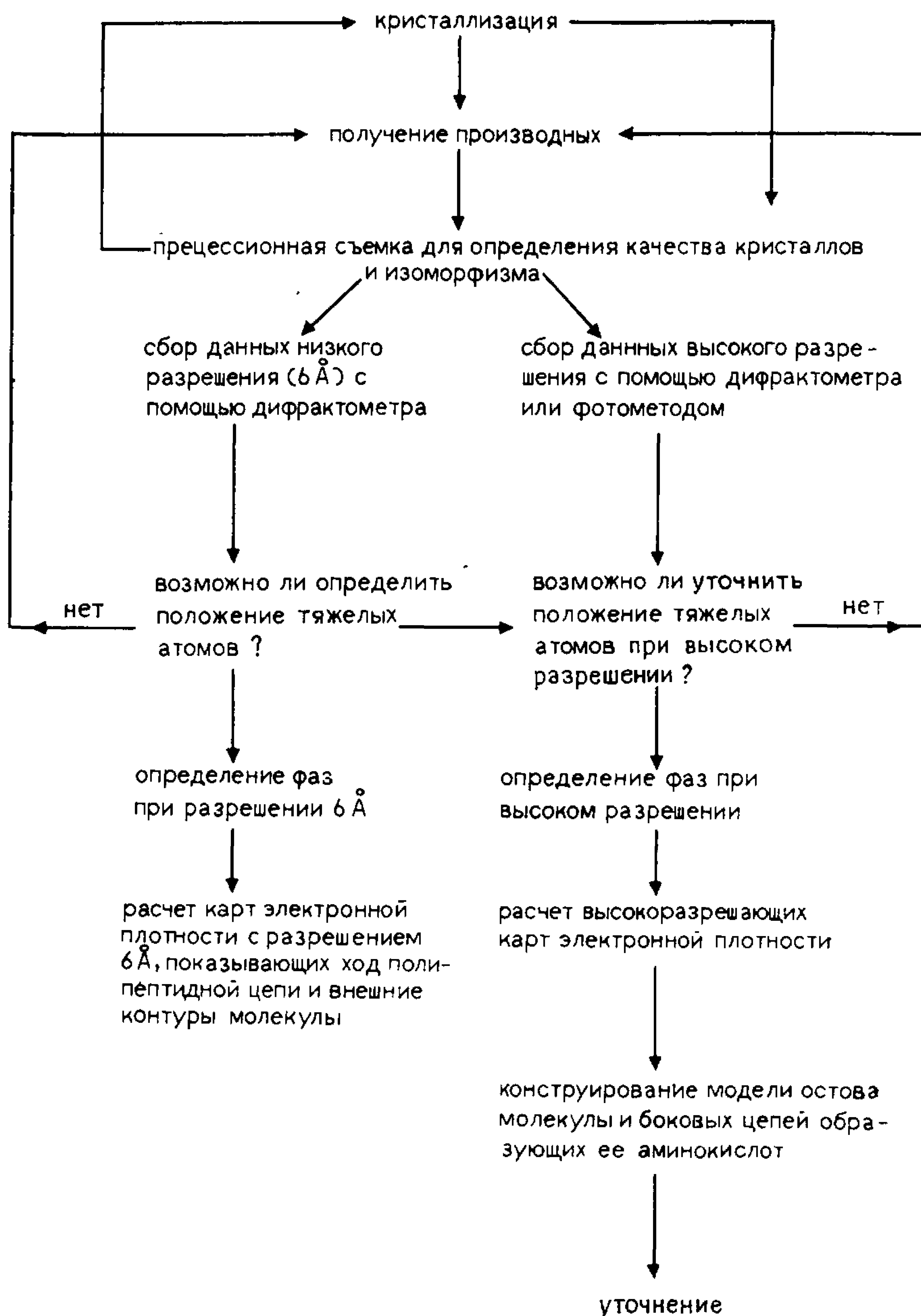


РИС. 20.8. Кристаллографическое исследование белков. Указаны и те этапы исследования, на которых необходимо тщательно проанализировать полученные результаты, прежде чем продолжить работу.

исследования. Известно несколько методик выращивания кристаллов, но ни одна из них не универсальна. Поэтому, если исходный материал имеется в достаточном количестве, целесообразно поставить несколько параллельных экспериментов, используя различные методики. При этом приходится подбирать условия, а с учетом того, что кристаллизация белков — это мед-

ленный процесс, получение кристаллов белков очень кропотливое дело, требующее от экспериментатора огромного терпения. Все существующие методики кристаллизации основаны на получении пересыщенных растворов белка и образовании в них зародышей кристаллов. Например, для получения пересыщенного белкового раствора можно добавлять насыщенный раствор сульфата аммония (высаливание). В противоположность этому простому способу можно использовать так называемое градиентное пересыщение раствора, которое обусловлено изменением температуры раствора, диффузией соли через диализную мембрану или испарением воды (диффузия через газовую фазу). Кроме того, переход раствора в пересыщенное состояние может происходить и при добавлении к раствору белка органических растворителей, например при их диффузии через газовую фазу в результате испарения [1, 9, 10]. Качество получаемых кристаллов обычно улучшается, если белок тщательно очищен от примесей, например путем изоэлектрического фокусирования [2].

Выбор конкретной методики получения кристаллов часто зависит от того, какое количество белка имеется в распоряжении экспериментатора. Для белков, хорошо растворимых в воде, обычно используют растворы с концентрацией ~20 мг/мл. При кристаллизации в каплях объем одной пробы составляет ~10 мкл. При использовании микродиализа или микрообъемного метода работают с такими же порциями раствора. Поэтому 1 мл раствора (или 200 мг белка) может хватить на ~100 проб. При бережном обращении с белковым раствором и хорошем выходе кристаллов 20 мг белка может оказаться достаточным для обеспечения всего структурного исследования кристаллами или по крайней мере для выяснения возможностей дальнейшей работы.

Получение кристаллов достаточно большого размера еще не гарантирует, что структурное исследование будет успешным. Во-первых, необходимо убедиться с помощью рентгеновской съемки, например с использованием прецессионной камеры, что кристаллы в достаточной степени совершенны и, следовательно, дифракционные данные могут быть собраны вплоть до высокого разрешения. Во-вторых, кристаллы должны быть подходящего типа, так как слишком сложная (или слишком простая) упаковка молекул в элементарной ячейке может сделать выяснение структуры невозможным. В-третьих, кристаллы должны быть устойчивы к действию рентгеновского излучения, так чтобы с одного кристалла можно было получить несколько снимков высокого разрешения. В-четвертых, методика получения кристаллов должна хорошо воспроизводиться, чтобы полное структурное исследование было обеспечено идентичными кристаллами,

поскольку полный набор дифракционных данных обычно не удается получить с одного кристалла.

20.1.4.3. Получение тяжелоатомных производных. Вообще говоря нельзя исключить, что введение в растворе в белковую молекулу тяжелого атома не повлияет на ее кристаллическую структуру и модифицированный белок будет кристаллизоваться так же, как и нативный. Однако в большинстве случаев производные, содержащие тяжелые атомы, получают при выдерживании кристаллов белка в растворах солей подходящих металлов. Это вызвано тем, что для структурного исследования необходимо, чтобы кристаллы нативного и модифицированного белка имели абсолютно одинаковую молекулярную упаковку и отличались только наличием нескольких атомов тяжелого металла в расчете на одну белковую молекулу. Поэтому целесообразно попытаться модифицировать белковые молекулы, исходно упакованные требуемым образом. Не исключено, однако, что молекулы в кристалле будут упакованы так, что соответствующие центры связывания окажутся недоступными.

Трудности в получении производных вызваны невозможностью надежного предсказания свойств белковых молекул. Поэтому приходится применять метод проб и ошибок. В случае металлсодержащих белков (металлопротеинов) (т. е. для весьма ограниченных случаев) атомы металлов могут быть замещены на другие атомы, что делает возможным получение целого ряда производных. Кроме того, к специфическому присоединению тяжелых атомов может привести химическая модификация белка, а также добавление кофакторов или ингибиторов. Однако, как правило, места присоединения тяжелых атомов удается выяснить только после расшифровки структуры; связывание этих тяжелых атомов определяется особенностями трехмерной организации боковых цепей аминокислот в кристалле. Поскольку пространственная организация экспонированных боковых цепей может зависеть от pH и ионной силы, то именно эти параметры и являются переменными при поиске условий получения производных. Особое внимание следует уделять оптимизации условий получения производных так, чтобы они приводили к воспроизводимым продуктам, а число металлических атомов, присоединившихся к каждой молекуле, было невелико. Возможно также, что выдерживание кристаллов в течение разного времени и/или в растворах с разной концентрацией одной и той же соли тяжелого металла будет иметь своим результатом два продукта с различным содержанием тяжелого атома (в одном производном этот атом присоединен по одному положению, а другом — по двум).



РИС. 20.9. Размещение белкового кристалла и капель маточного раствора в тонкостенном капилляре для рентгеновской съемки.

Число положений, по которым произошло замещение, определяется в ходе кристаллографического исследования; этот параметр характеризует вероятность присутствия тяжелого металла в любой из молекул, образующих кристалл. Важно, чтобы условия получения производных воспроизводимо обеспечивали возможность получения кристаллов с высокой степенью заполнения мест связывания [1, 9].

20.1.4.4. Подготовка рентгеновской съемки кристаллов нативного белка или его производных. Закрепление кристаллов в капиллярах. После того как кристаллы и их производные получены, необходимо исследовать их с помощью рентгеновской дифракции, чтобы определить пригодность для дальнейшей работы. Существуют два первичных критерия: разрешение и изоморфизм. Для того чтобы можно было провести рентгеновские съемки, кристалл должен быть помещен в тонкостенный капилляр (рис. 20.9). С помощью тонкой пастеровской пипетки кристалл вместе с каплей маточного раствора переносят из кристаллизационной ячейки в капилляр. Для предотвращения изменения ионной силы во время съемки (например, в результате высыхания) в один из концов капилляра помещают дополнительную каплю маточного раствора и открытый конец капилляра герметично заклеивают зубным воском. Для удаления избытка жидкости вблизи кристалла пользуются тонкими полосками фильтровальной бумаги. Удаление избытка жидкости снижает фоновое рассеивание рентгеновских лучей, и кристалл лучше удерживается в неком фиксированном положении силами поверхностного натяжения следовых количеств жидкости вокруг него. В оставшийся открытым конец капилляра вводят еще одну каплю маточного раствора и закрывают его воском (рис. 20.9). Обычно начинают с того, что концы тонкостенного капилляра (длиной 30—40 мм) заранее покрывают воском так, чтобы после внесения кристалла и маточного раствора его можно было закупорить быстро и герметично.

20.1.4.5. Проверка качества кристаллов. Первоначальное тестирование кристаллов проводят с помощью съемки в прецессионной камере; в результате получают дифракционную картину, подобную той, которая представлена на рис. 20.4. Такая съемка дает общую характеристику качества кристалла. Дифракционная картина должна состоять из дискретных пятен, расположенных в узлах регулярной решетки, которая в удачных случаях достигает края изображения на фотопластинке. Разрешение определяется тем, как далеко от центра фотопластинки еще наблюдаются дифракционные пятна. Необходимо однако учитывать особенности геометрии прецессионной камеры. Так, например, при выборе слишком большого угла прецессии, позволяющего получать рефлексы до разрешения 0,1 нм, может оказаться, что реальное разрешение на снимках не превышает 0,6 нм. В то же время не исключено, что уменьшение угла прецессии до величины, ограничивающей разрешение, скажем до 0,3 нм, может привести к появлению на снимках рефлексов, соответствующих этому разрешению.

Другое важное свойство кристалла, которое требуется проверить, — его радиационная устойчивость. Для этого проводят серию дифракционных снимков в стандартных условиях через определенные промежутки времени. О радиационном повреждении кристалла судят по ухудшению разрешения. Кристаллы, пригодные для работы, должны выдерживать по крайней мере одну дневную экспозицию в рентгеновском пучке без каких-либо видимых изменений на прецессионном снимке.

Об изоморфизме производных говорят при сохранении постоянства параметров кристаллической решетки, которые рассчитываются с помощью параметров обратной решетки, отображенной на снимках. При наложении таких снимков с нативного и производного кристаллов дифракционные пятна должны совмещаться. Информация о расположении тяжелых атомов в элементарной ячейке и соответственно фазах дифракционных максимумов содержится в изменениях их интенсивностей. Эти изменения должны быть заметными, но не слишком большими, так как в этом случае они могут быть обусловлены конформационными изменениями белковых молекул. Если же изменения в интенсивностях пятен не выявляются, следует использовать другое производное. Для определения положения тяжелых атомов применяются специальные методы белковой кристаллографии. Однако решить эту задачу удается не всегда, так как при связывании металлов из-за конформационных или ориентационных изменений молекул может нарушаться изоморфизм. Другой причиной может быть множественность присоединения тяжелых атомов, что приводит к невозможности расшифровать дифракционные картины.

20.1.4.6. Некоторые особенности кристаллографии больших молекул. В белковой кристаллографии структура молекул определяется на основе расчета распределения электронной плотности во всем объеме элементарной ячейки нативного кристалла. Для этого необходимо выяснить положение тяжелых атомов в производных, что и позволит рассчитать фазы всех дифракционных максимумов нативного кристалла. В ходе этой работы часто возникают серьезные затруднения, обусловленные большим размером исследуемых молекул. В отличие от кристаллографии малых молекул здесь необходимо измерять интенсивности огромного количества дифракционных максимумов, работать с большими по размеру картами электронной плотности и конструировать модели молекул, состоящих из большого числа атомов.

20.1.4.7. Сбор экспериментальных данных. В ходе развития методов белковой кристаллографии были созданы дифрактометры, измеряющие с помощью счетчика интенсивности рассеянного излучения. Такой дифрактометр автоматически помещает счетчик в область нахождения дифракционного максимума и соответствующим образом ориентирует кристалл в пучке рентгеновских лучей. Разработаны также устройства, позволяющие учитывать существование дефектов кристаллической решетки и фонового рассеянного излучения. Автоматические дифрактометры позволяют проводить измерения целых наборов данных по интенсивностям дифракционных максимумов и записывать их на перфокартах, бумажных лентах или любым другим способом, позволяющим ввести данные в ЭВМ. Кроме того, дифрактометр может быть непосредственно связан с ЭВМ, что облегчает работу экспериментатора и позволяет проводить измерения с большей точностью и надежностью. В настоящее время эти приборы широко используются для структурных исследований при низком разрешении (до 0,6 нм), где число анализируемых рефлексов относительно невелико. Однако следует признать, что эффективность применения таких приборов все же недостаточно высока. Из-за большого размера элементарной ячейки белковые кристаллы отражают рентгеновское излучение в широком диапазоне углов, тогда как обычный счетчик может в данный момент времени работать только с одним из отражений. Поэтому время, необходимое для сбора полного набора данных, часто превышает время жизни кристалла в рентгеновском эксперименте. А это в свою очередь делает необходимым объединение данных, полученных на разных кристаллах.

Для работы при низком разрешении или с белками малой молекулярной массы ограниченное время жизни кристаллов не вызывает серьезных проблем. Однако с увеличением молекулярной массы исследуемой молекулы или при повышении разреше-

ния возникает необходимость в увеличении эффективности методов сбора данных. Один из путей увеличения эффективности состоит в применении двумерного детектора, представляющего собой периодическую решетку из счетчиков, улавливающих каждый фотон, рассеянный кристаллом. Конструкции таких приборов, работающих под контролем ЭВМ, активно разрабатываются в настоящее время.

Проблему увеличения эффективности сбора данных удалось частично решить с помощью фотометода. При использовании прецессионных фотографий наиболее сложная часть работы связана с индексированием рефлексов, т. е. с приписыванием каждому из рефлексов соответствующих индексов Миллера *h*, *k* и *l*. Вместе с тем при получении таких фотографий используются металлические экраны, перекрывающие рефлексы от всех слоев сферы отражения, кроме исследуемого. При этом часть информации теряется. По-видимому, более эффективна безэкранная съемка. Индексирование фотографий, полученных таким методом и являющихся суперпозицией многих слоев сферы отражения, проводят с помощью ЭВМ. Поэтому одним из этапов обработки экспериментальных данных является преобразование дифракционной картины в двумерную карту распределения оптической плотности с помощью автоматических денситометров.

20.1.5. Конструирование моделей

Обработка и анализ экспериментальных данных завершается расчетом карты распределения электронной плотности внутри элементарной ячейки кристалла, которая хранится в памяти ЭВМ. Такая карта позволяет проследить ход полипептидной цепи молекулы, но еще не выявляет структуру на уровне атомного разрешения. Для перехода к атомному разрешению необходимо построить модель, «вписывающую» полипептидную цепь в карту электронной плотности с учетом известных стереохимических данных для полипептидного остова молекулы и боковых цепей образующих ее аминокислот. Для этого с помощью ЭВМ рассчитывают ряд сечений карты электронной плотности, которые в подходящем масштабе переносят на прозрачную пленку. Будучи сложенными в стопку, они воспроизводят распределение электронной плотности в элементарной ячейке кристалла. Однако без специальных приспособлений визуальный анализ структуры затруднен. Поэтому сечения или их выбранные районы укрепляются в вертикальной раме и освещаются сзади и сбоку. Перед рамой размещают полупрозрачное зеркало. Атомную модель молекулы собирают перед зеркалом так, чтобы ее зеркальное изображение совмещалось с картой распределения электронной плотности [11] (рис. 20.10).

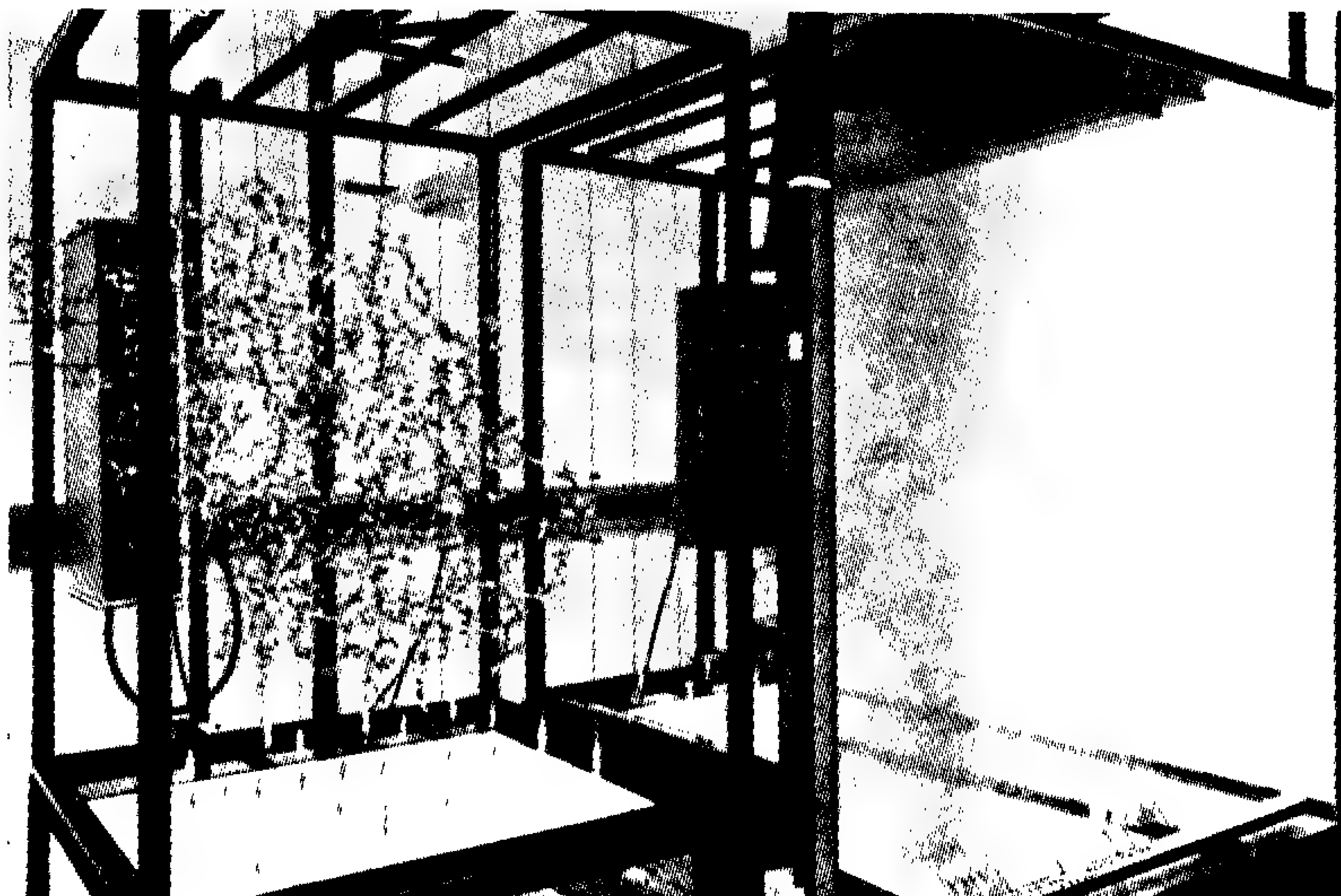


РИС. 20.10. Устройство для конструирования проволочной модели белковой молекулы, отражающейся внутри карты электронной плотности. Полупрозрачное зеркало, находящееся в средней части устройства (между моделью и картой), убрано, для того чтобы карта электронной плотности была видна на фотоснимке.

20.1.6. Конструирование моделей с помощью средств компьютерной графики

Конструирование моделей молекул с помощью ЭВМ, несомненно, имеет ряд преимуществ перед описанным выше способом, хотя оно и не свободно от недостатков. Компьютерная графика, бурно развивающаяся в настоящее время, способна генерировать изображения структурных элементов молекул (например, аминокислот) и совмещать их с контурами карт электронной плотности. Это достигается тем, что ортогональные изображения или стереопары структурных элементов могут выводиться на экран одновременно с трехмерной картой электронной плотности (рис. 20.11). К преимуществам таких систем следует отнести возможность автоматического уточнения положения аминокислотных остатков, учета вандерваальсовых взаимодействий, а также возможность введения дополнительных обозначений, например прерывистых линий, показывающих расположение водородных связей. Следует признать, что использование средств компьютерной графики предпочтительно, несмотря на высокую стоимость графических устройств и их программного обеспечения, а также существующие в настоящее время ограничения на

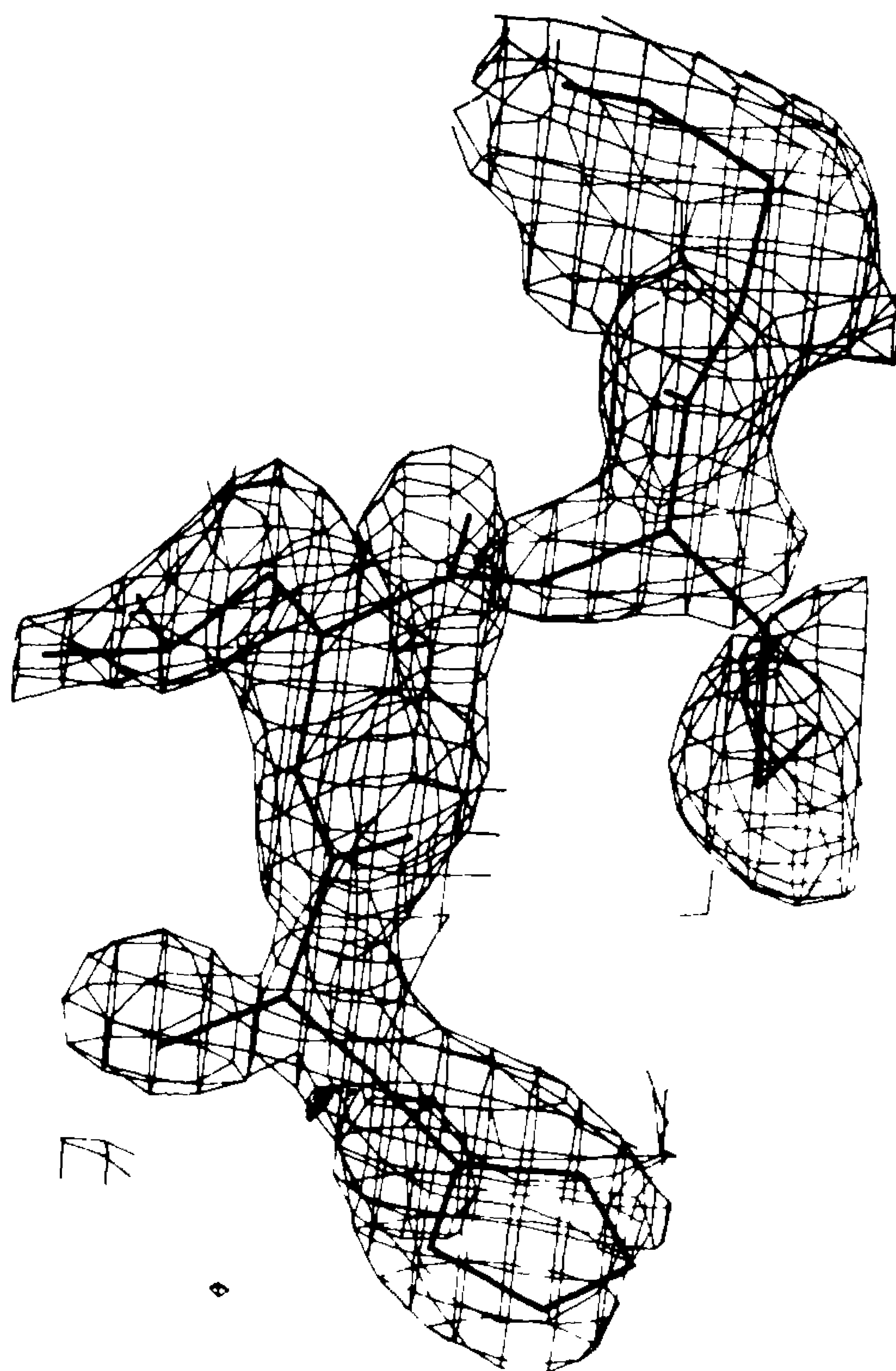


РИС. 20.11. Структура B5-B8 участка молекулы гормона инсулина, отображенная средствами компьютерной графики. На экран одновременно выведены карта электронной плотности и модель структуры.

скорость выполнения расчетов и размеры отображаемых структур. Эти ограничения приводят к тому, что лишь относительно небольшие участки полипептидной цепи могут выводиться на экран.

20.2. Электронная микроскопия

20.2.1. Введение

В отличие от рентгеноструктурного анализа электронная микроскопия дает изображение исследуемого объекта. В настоящее время электронные микроскопы широко распространены и во многих лабораториях может быть оказана квалифицированная

помощь как по использованию приборов, так и по методам подготовки образцов для исследования. В результате «просвечивания» в электронном микроскопе получают непосредственно изображения, правильная интерпретация которых позволяет извлечь информацию о структуре изучаемых молекул. Для обычной работы исследователю бывает достаточно минимального знакомства с физическими основами метода. Разумеется, однако, что более углубленное понимание этих процессов, а также практический опыт позволяют уверенно и быстро получать надежные результаты.

Принципиальное различие между рентгеновской дифракцией и электронной микроскопией состоит в том, что пучок электронов, рассеянных объектом может быть собран электромагнитной линзой так, чтобы воспроизвести его увеличенное изображение. Поэтому электронная микроскопия чрезвычайно удобна как инструмент исследования. Электронные микроскопы получили очень широкое распространение, что позволило повысить их качество и надежность, а также сделать удобными и легкими в обращении. В настоящее время любой биохимик может иметь доступ к высококачественному прибору. На первых стадиях исследования просмотр образцов может вести квалифицированный оператор. При необходимости биохимик может продолжить электронно-микроскопическое исследование самостоятельно, получив предварительно несколько уроков у квалифицированного исследователя.

20.2.2. Разрешение и ограничения метода

В микроскопии разрешение зависит от длины волны используемого излучения. В световом микроскопе при длине волны 500 нм разрешение не превышает 250 нм. Использование рентгеновской дифракции и расчет изображений с помощью ЭВМ позволяют достичь разрешения 0,1 нм при длине волны излучения 0,15 нм. В электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 100 кВ длина волны электронов составляет ~0,003 нм. Однако по техническим причинам реальное разрешение этих приборов достигает лишь ~0,3 нм, что в принципе уже позволяет различать многие детали структуры молекул. К сожалению, в случае биологических материалов чрезвычайно трудно приготовить образцы для исследования, сохранив их структуру неизменной на уровне таких разрешений. Ограничение разрешения обусловлено не микроскопом, а существующими в настоящее время методами подготовки образцов для микроскопирования, позволяющими сохранить исследуемую структуру в вакууме при бомбардировке пучком электронов.

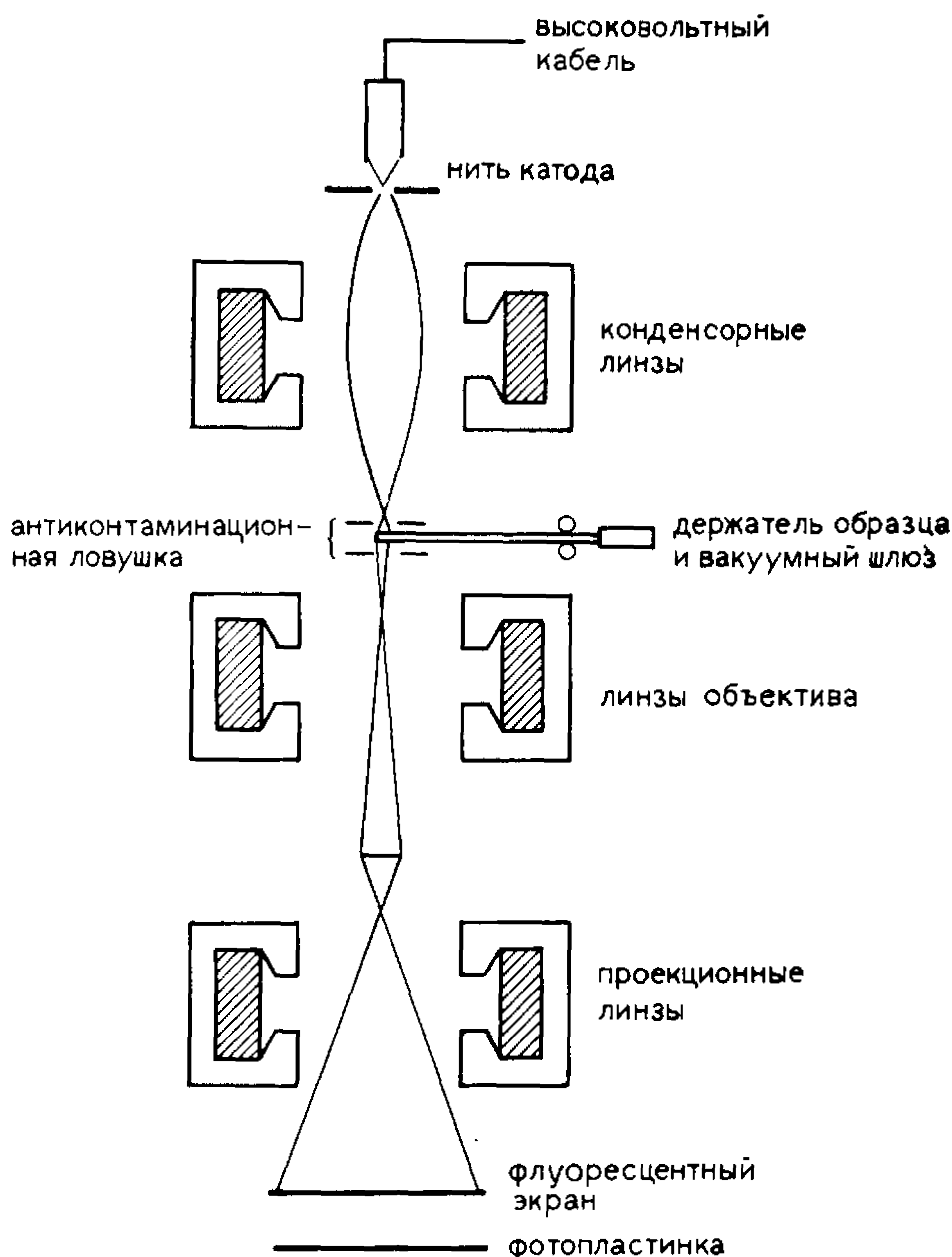


РИС. 20.12. Схема расположения основных линз в электронном микроскопе. В отличие от оптического микроскопа в электронном микроскопе источник излучения располагают сверху, а увеличенное изображение формируется внизу.

Традиционным способом решения этой проблемы является «окрашивание» структур тяжелыми металлами. Поэтому обычно получаемое изображение представляет собой картину распределения окрашивающего вещества в исследуемом образце, на основании которой можно судить об особенностях молекулярной структуры объекта. Разрешение в этих случаях, как правило, не превышает 1,5 нм. Для повышения разрешения вплоть до 0,6 нм сравнительно недавно были разработаны новые методы микроскопирования молекул. В этих методах увеличение отношения величин полезного сигнала и шума достигается, как и в случае рентгеновской дифракции, использованием упорядоченных молекулярных образований — кристаллов. Ниже будут рассмотрены принципы рутинных методов электронной микроскопии, а затем и их новейшие усовершенствования.

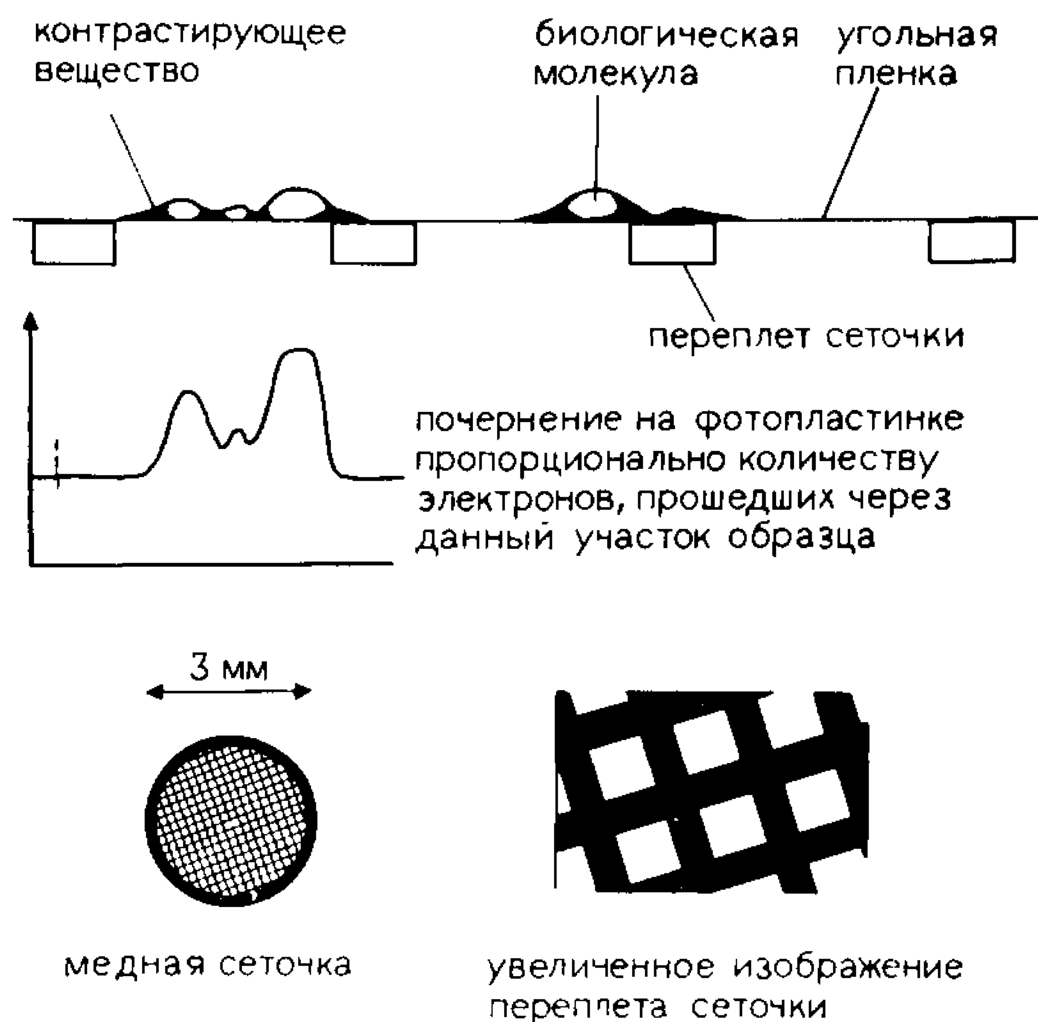


РИС. 20.13. В электронном микроскопе образец помещают на угольную пленку, поддерживаемую медной сеточкой (медь обеспечивает хороший электрический и термический контакт препарата с держателем образца). Верхняя часть рисунка иллюстрирует метод негативного контрастирования.

20.2.3. Электронный микроскоп

Электронный микроскоп аналогичен световому в том отношении, что в него входят линзы, формирующие изображение (рис. 20.12). Электроны излучаются горячей нитью катода электронной пушки и ускоряются за счет высокой разности электрических потенциалов между пушкой и остальной частью микроскопа. Поток таких электронов эквивалентен пучку монохроматического света, и поэтому все теоретические принципы, лежащие в основе световой микроскопии, применимы и к электронной. В большинстве современных микроскопов исследуемый образец помещается на тонкую угольную пленку, поддерживаемую медной сеточкой (рис. 20.13). Держатель образца сконструирован так, чтобы образец можно было легко перемещать внутри микроскопа, но в то же время чтобы не происходило его самопроизвольного смещения и не было вибраций при визуальном наблюдении и фотографировании.

Образец размещают внутри специального устройства — антиконтаминационной ловушки, охлаждаемой до температуры жидкого азота с помощью медного стержня, соединенного с резервуаром для охлаждающего агента. Благодаря низкой температуре на поверхности этого устройства конденсируются вещества, испаряющиеся из образца при его бомбардировке элек-

тронами, а также любые загрязнения, которые могут попасть в микроскоп. При взаимодействии электронного пучка с молекулами могут возникать химически активные свободные радикалы, реагирующие с веществом образца и подложки. В отсутствие низкотемпературной ловушки это приводит к образованию на образце слоя загрязнений, который снижает разрешение и часто приводит к артефактам.

Ниже образца размещена первая группа электромагнитных линз, функционально эквивалентная объективу оптического микроскопа. Еще ниже находятся проекционные линзы, проецирующие изображение на флюоресцентный экран для прямого наблюдения или фотопленку для получения микрофотографии.

Изменение фокусного расстояния проекционных линз приводит к изменению увеличения, создаваемого электронным микроскопом. Увеличение может достигать ×250 000, и обычно его можно поднять еще втрое при фотопечати без снижения разрешения деталей структуры на микрофотографиях. Фокусное расстояние проекционной системы регулируется током, протекающим через катушки магнитных наконечников линз. По этой причине электронные устройства, входящие в состав микроскопа, должны отвечать очень высоким требованиям, обеспечивающим возможность не только изменять ток, протекающий через линзы, но и жестко стабилизировать его на любом заданном уровне. В противном случае увеличение будет непрерывно меняться.

Фокусирование изображения достигается изменением тока, протекающего через объективную линзу, и это необходимо делать после каждого изменения увеличения. В ходе нормальной работы микроскоп просто переключают на требуемое увеличение (при этом его электронные системы сами устанавливают в соответствующих линзах требуемые токи), а затем фокусируют изображение, регулируя ток объективной линзы.

20.2.4. Технические проблемы

Поскольку изображения молекул возникают в результате их взаимодействия с электронами, можно ожидать, что присутствие любых посторонних атомов будет приводить к снижению качества изображения. Поэтому внутри колонны микроскопа создается вакуум. В этих условиях помещенный в микроскоп образец будет неизбежно подвергаться дегидратации. Ниже рассмотрены методы, позволяющие избежать изменений структуры исследуемых образцов при их дегидратации.

Другой нежелательный эффект возникает из-за взаимодействия электронов с самим образцом. Он обусловлен не только разрушающим действием электронов высоких энергий, но и воз-

никновением высокореакционноспособных химических радикалов, что приводит к загрязнению образца при его микроскопировании. Влияние химических радикалов может быть снижено размещением вблизи образца медной диафрагмы, охлажденной до температуры жидкого азота, которая сорбирует на своей поверхности загрязняющие образец частицы. Разрушающее действие собственно электронов может быть уменьшено только снижением дозы облучения. Более подробно это рассмотрено в разделе, посвященном молекулярной микроскопии.

Влияние эффектов дегидратации, загрязнения и радиационного повреждения может быть уменьшено «окрашиванием» образцов солями тяжелых металлов. Такое окрашивание проводят перед высушиванием образца, и связавшийся с ним «краситель» значительно менее чувствителен к действию дегидратации и электронной бомбардировке, чем легкие атомы, образующие объект. Кроме того, соли тяжелых металлов обладают значительно большей электронной плотностью, что уменьшает влияние загрязнений на качество изображения. Однако и в этом случае необходимо добиваться максимальной чистоты внутренних элементов конструкции микроскопа и поддерживающих образец медных сеточек, а также применять различные технические средства, позволяющие уменьшить дозу облучения образца.

20.2.5. Подготовка образцов и их «окрашивание»

Для электронного микроскопирования биологические объекты обычно заключают в подходящий полимерный носитель и затем разрезают на тонкие слои с помощью стеклянного или алмазного ножа. При изучении макромолекул исследователь имеет дело с их раствором в подходящем буфере. Два фактора определяют выбор такого буфера: во-первых, летучесть в процессе высушивания и, во-вторых, инертность к «красителю». В практике чаще всего используют буфер, приготовленный на основе ацетата аммония. И хотя такой буфер летуч, не следует забывать, что в процессе высушивания образца он многократно концентрируется. Иногда такое концентрирование буфера приводит к изменению структуры или, например, агрегации молекул так, что их микроскопирование после «окрашивания» выявляет наличие искажений или разрушения исследуемого объекта.

В микроскопе образец помещают на тонкую (~15 нм) углеродную пленку. Такую пленку можно получить путем конденсации паров углерода на поверхности свежего скола слюды. Для изготовления пленки используют углеродные стержни диаметром 5 мм. Конец одного из стержней длиной 10 мм стачивают до диаметра 1,5 мм и заостряют. Заточенный кончик такого

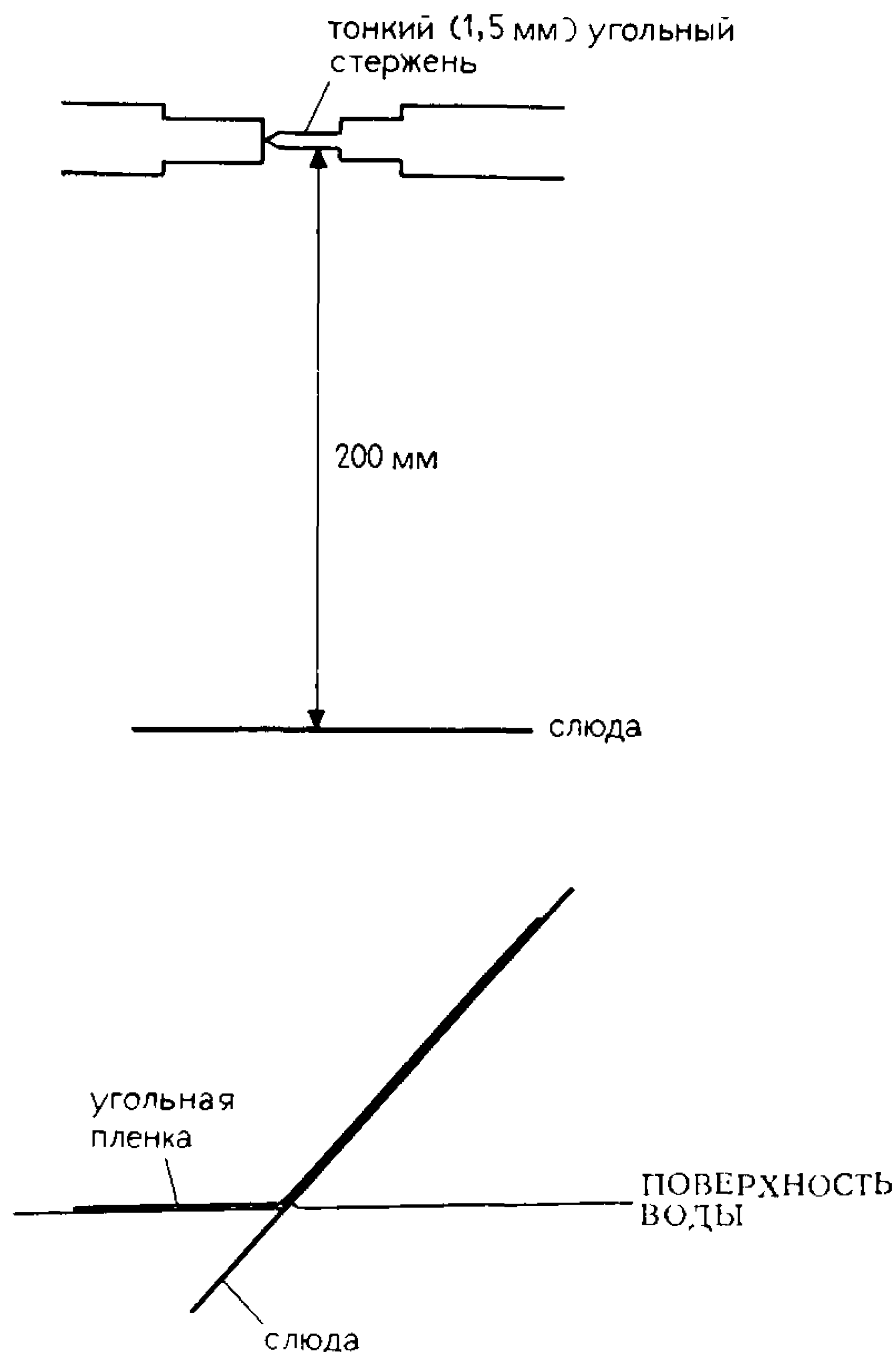


РИС. 20.14. Испаряемый в вакууме углерод конденсируется на поверхности слюды, и образовавшуюся пленку можно снять на поверхность воды.

стержня приводят в контакт с плоским торцом второго стержня и испаряют, пропуская через область контакта электрический ток силой ~30 А. Испарение происходит в самой тонкой части стержня, а постоянство контакта осуществляют поджатием одного из стержней с помощью пружины (рис. 20.14).

Испаряемый углерод конденсируется на поверхности слюды, расположенной на расстоянии ~200 мм от источника испарения. Если поместить за слюдой листок белой бумаги, она также покроется слоем углерода с тенью от кусочка слюды. При наличии некоторых навыков контрастность «затененного» участка можно использовать в качестве удобного визуального критерия толщины углеродного слоя.

Углеродную пленку можно легко удалить с поверхности слюды, поскольку она чрезвычайно гидрофильна. Это делается мед-

ленным погружением слюды в чистую воду под углом ~45° относительно поверхности воды. Угольная пленка отделяется от слюды и всплывает на поверхность воды, где ее можно перемещать, например, с помощью тонкого волоска. Очень важно на всех этапах приготовления таких пленок соблюдать чистоту. Так, подрезание краев пластинки слюды надо выполнять тонкими ножницами, а расщеплять и держать ее следует только пинцетом. Чашка Петри для воды должна быть вымыта с применением детергента, который надо тщательно отмыть. После прокаливания в пламени ее заполняют водой, перегнанной в стеклянном дистилляторе. Такие предосторожности позволяют избежать загрязнений поверхности слюды и воды, которые могут мешать снятию пленки.

Такие тонкие пленки монтируют на мелкоячеистые (200 или 400 меш) медные сеточки диаметром 3 мм. Целесообразно поместить сразу несколько их десятков на подставку или проволочную сетку, расположенную ниже поверхности воды, еще до того, как снимать угольную пленку со слюды. В этом случае для того, чтобы смонтировать пленку, достаточно после ее снятия со слюды просто поднять подставку или понизить уровень воды. При аккуратном выполнении описанных выше процедур большая часть сеточек оказывается покрытой угольной пленкой по всей поверхности. Следует помнить, что сеточки и подставка должны быть предварительно обезжирены органическим растворителем или прокаливанием. Смонтированную угольную пленку высушивают на воздухе и хранят в эксикаторе.

20.2.5.1. «Окрашивание» образцов. Существуют два типа «окрашивания» — позитивное и негативное. При позитивном «окрашивании» молекулы «красителя» (соли тяжелых металлов) присоединяются к тем или иным группировкам макромолекулы [12]. В случае негативного «окрашивания», чаще называемого негативным контрастированием, макромолекулы заключаются в тонкую пленку контрастирующего вещества. На рис. 20.13 показано, как при этом образуются области, недоступные для контрастирующего вещества и, следовательно, обладающие меньшей электронной плотностью [6, 8].

При позитивном проявлении образец вначале окрашивают в растворе, а затем помещают на сеточку. При негативном контрастировании каплю раствора, содержащего исследуемый объект, помещают на сеточку, покрытую углеродной пленкой. Обычно одной минуты достаточно, чтобы молекулы или частицы исследуемого образца адсорбировались на пленке. Затем жидкость удаляют, прикасаясь ребром сеточки к фильтровальной бумаге. Не дожидаясь полного высыхания, на сеточку наносят каплю раствора «красителя». Через ~15 с раствор контрасти-

рующего вещества по возможности полностью удаляют фильтровальной бумагой и сеточку сушат на воздухе.

Важно, чтобы угольная пленка была смачиваемой. Это обычно бывает заметно после удаления избытка жидкости с ее поверхности. Смачиваемость пленки меняется в зависимости от атмосферных условий, продолжительности и условий ее хранения. Существуют различные способы улучшения смачиваемости, если по каким-либо причинам образец или «краситель» не растекаются по ее поверхности. Простейший из них состоит в увеличении времени, в течение которого образец находится на сеточке. Можно также просто перед использованием подержать сеточки с пленкой в увлажненной чашке Петри несколько часов. И наконец, можно подвергнуть пленку ультрафиолетовому облучению или ионной бомбардировке. Правда, в этих случаях пленка может стать слишком гидрофильной, так что капли будут растекаться по обеим поверхностям.

20.2.5.2. Оттенение. Другой метод увеличения контрастности изображений состоит в покрытии поверхности образца тонким слоем атомов тяжелого металла, испаряемого при высокой температуре. Источник испаряемого металла располагают под некоторым углом относительно образца, так чтобы поток испаряемых атомов конденсировался в соответствии с рельефом на поверхности. Контрастность обеспечивается тем, что испаряемый металл конденсируется преимущественно на выступающих частях поверхности образца. Из изображений, полученных с помощью такого метода, можно извлечь количественную информацию о распределении контрастирующего вещества по контурам структур [13]. Некоторые проблемы, возникающие при таком способе контрастирования образца можно обойти, если вращать его во время оттенения.

Разрешение на оттененных образцах невелико. Процесс оттенения происходит обычно успешно, если образец имеет неровную поверхность и вся содержащаяся в нем вода удалена. Однако разрушения нативной структуры могут быть значительными, хотя основные ее особенности и сохраняются.

20.2.6. Обработка изображений

Окончательным результатом собственно электронно-микроскопического исследования является получение изображения на фотопластинке. В некоторых случаях исследуемые молекулы могут быть организованы в виде двумерных решеток, называемых также двумерными кристаллами. Для таких объектов существуют методы, позволяющие значительно улучшить качество их изображений. Одним из инструментов для обработки изобра-

жений является оптический дифрактометр (рис. 20.15). Электронная микрофотография кристалла является двумерной дифракционной решеткой, дающей серию дифракционных пятен при освещении лучом монохроматического света (рис. 20.16). Эти пятна можно рассматривать как результат дифракции светового пучка на усредненной повторяющейся элементарной ячейке структуры решетки, а любые отличия в структуре каждой ячейки от усредненной — как шум, приводящий к дифракционным отражениям, лежащим вне основных пятен. Если в состав дифрактометра включить еще одну линзу, то можно воспроизвести или реконструировать исходное изображение. Если при этом предварительно удалить лучи, рассеянные непериодической составляющей (шумовую компоненту) введением фильтра, то удается реконструировать изображение усредненной повторяющейся структурной единицы. Аналогичным образом можно «разделить» изображение, образованное двумя наложенными друг на друга решетками. Для этого достаточно просто отфильтровать (перекрыть) дифракционные максимумы, обусловленные одной из решеток, и реконструировать изображение, используя оставшиеся дифракционные максимумы. Очевидно, что в обоих приведенных примерах существенно улучшается информативность исходных микрофотографий.

20.2.7. Трехмерная электронная микроскопия

Изображения, которые мы видим в микроскоп, представляют собой двумерные проекции трехмерной структуры исследуемого объекта. Используя гониометр (устройство, позволяющее наклонять объект в электронном пучке) можно рассматривать его под различными углами. Набор таких изображений содержит гораздо больше информации о структуре, чем одно из них. Наиболее информативным, однако, было бы реконструировать на их основе трехмерную структуру объекта. Для некоторых объектов это действительно возможно сделать, хотя такая работа занимает много времени. Математический аппарат, используемый в данном случае, сходен с аппаратом рентгеновской кристаллографии. Изображения исследуемого объекта, снятые под различными углами, с помощью денситометра преобразуются в числовую форму и вводятся в память ЭВМ. Рассчитанное на ЭВМ трехмерное изображение структуры можно наглядно отобразить различными способами. Обычно его представляют в виде серии срезов, подобных тем, которые получают на микротоме для залитых в полимерный носитель гистологических образцов [3, 4].

К настоящему времени хорошие трехмерные карты электронной плотности были получены для нескольких хорошо упорядоченных «окрашенных» объектов. На рис. 20.17 показана такая

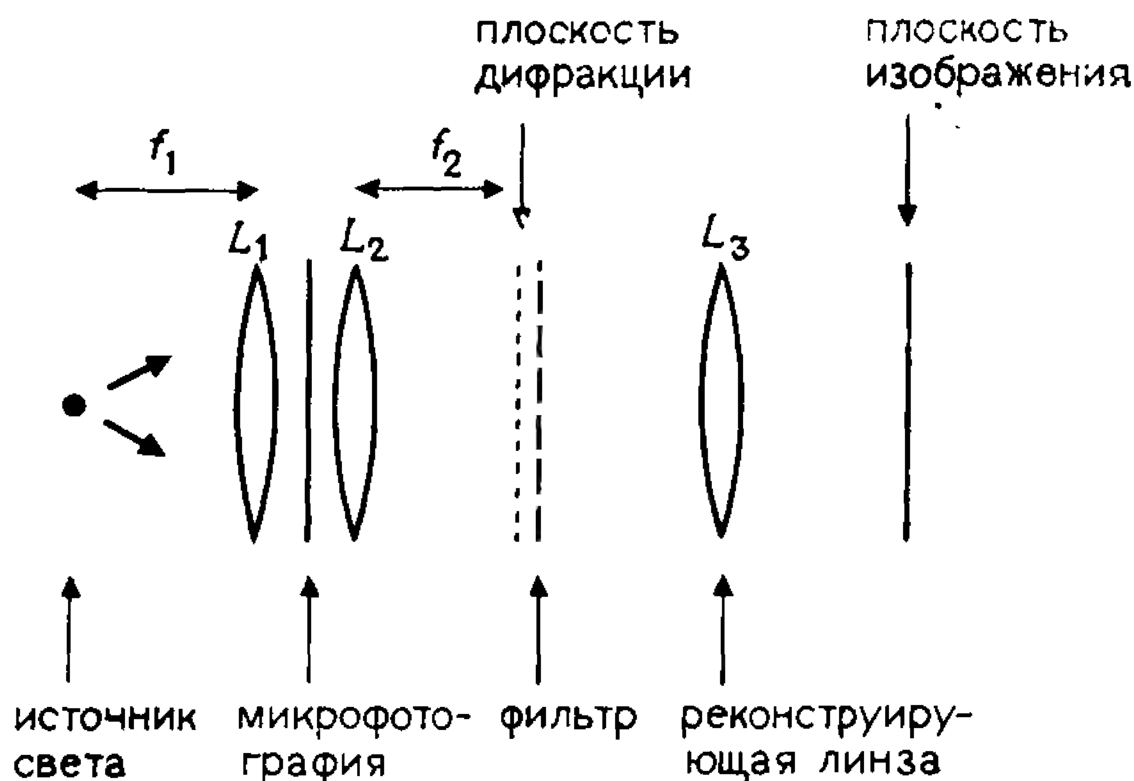


РИС. 20.15. Оптический дифрактометр, в котором микрофотография освещается параллельным пучком света, в результате чего формируется дифракционная картина. Фильтр и линза, расположенные после дифракционной картины, реконструируют профильтрованное изображение.

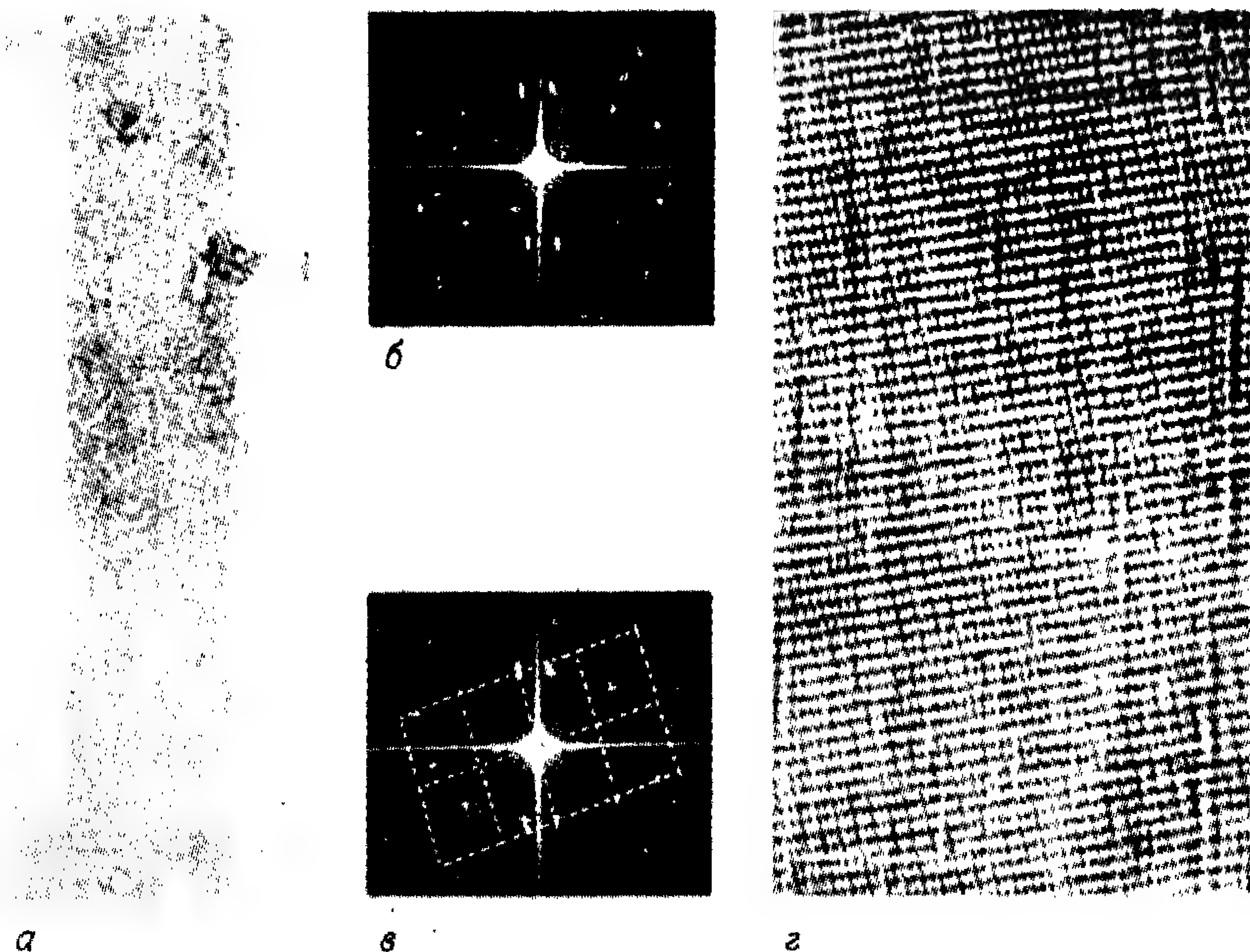


РИС. 20.16. Оптическая фильтрация изображения двухслойной структуры. *а* — микрофотография актиновой трубки; *б* — дифракционная картина от микрофотографии, содержащая максимумы от обоих слоев и представляющая собой суперпозицию двух обратных решеток; *в* — решетка дифракционных максимумов, выбранная для реконструкции и обозначенная пунктирными линиями; *г* — профильтрованное изображение, реконструированное по выбранной решетке.

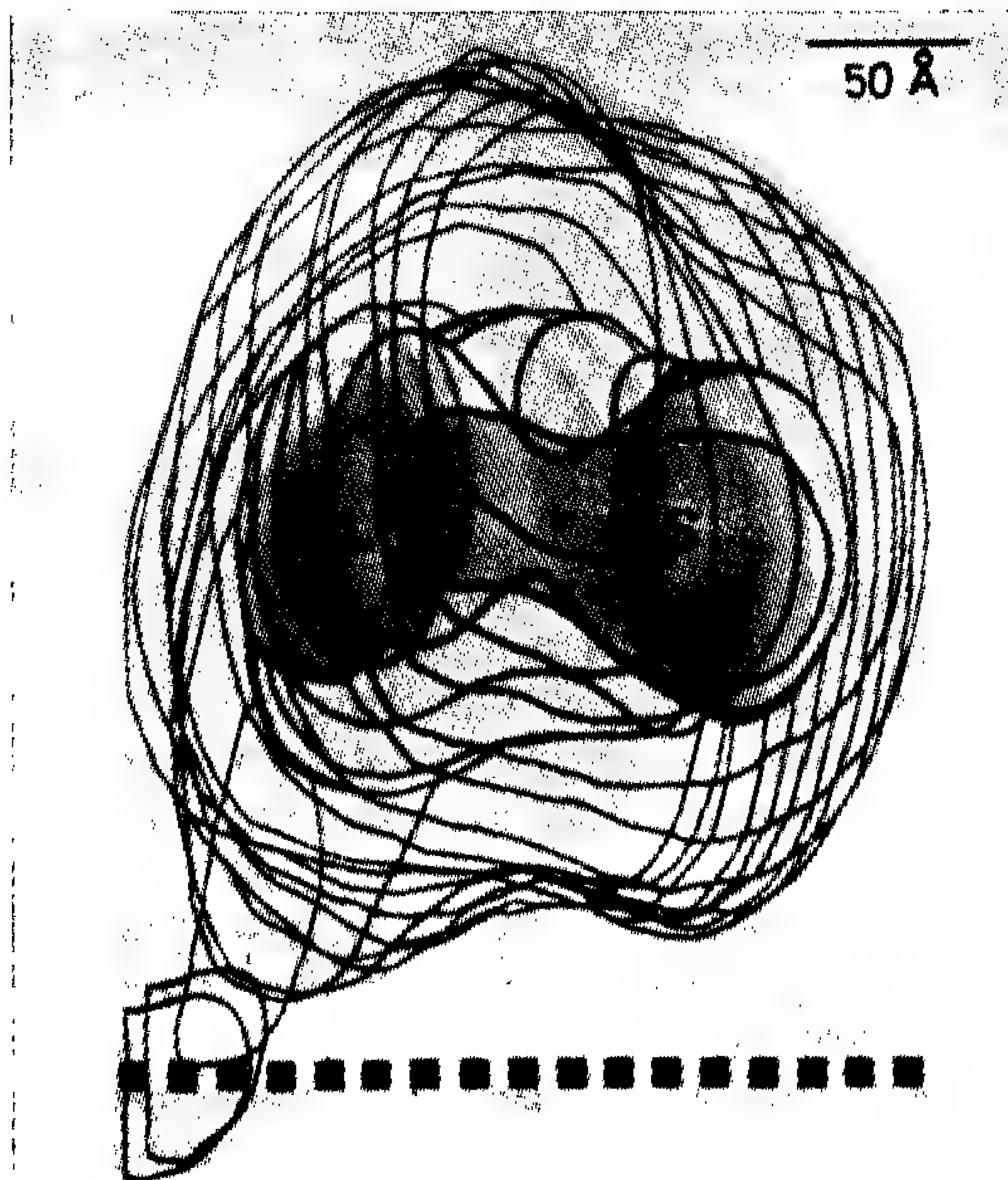


РИС. 20.17. Трехмерная реконструкция элементарной ячейки кристалла рибосомы, сделанная на основе серии микрофотографий, снятых под разными углами. Рибосомы были обнаружены в ооцитах ящерицы *Lacerta sicula* в кристаллическом состоянии. L и S — большая и малая субъединицы рибосомы.

карта, рассчитанная для кристаллов рибосомы [14]. Подобные карты аналогичны рентгеноструктурным картам низкого разрешения (5 нм).

20.2.8. Молекулярная микроскопия

Технические средства, используемые в трехмерной электронной микроскопии «окрашенных» образцов, могут быть применены и к «неокрашенным» объектам для исследования с более высоким разрешением. Теоретически это предполагает возможность прямого визуального наблюдения образующих молекулу атомов. Такое исследование «неокрашенных» образцов было проведено [7, 15], однако для этого пришлось разработать специальные методы микроскопирования и значительно более сложные методы обработки изображений на ЭВМ. Это обусловлено рядом причин. Во-первых, образец должен быть предохранен от дегидратации в вакууме микроскопа заливкой в тонкую пленку сахарозы. Во-вторых, «неокрашенный» образец не защищен от по-

вреждений контрастирующим веществом и, следовательно, время его облучения электронами должно быть столь коротким, чтобы радиационное разрушение было минимальным. В действительности это время настолько мало, что получаемые изображения обладают чрезвычайно низким контрастом. Поэтому информация о структуре может быть получена только для упорядоченных двумерных кристаллов.

Необходимость специальных методов обработки изображений обусловлена тем, что объект состоит из легких атомов, не окрашенных солями тяжелых металлов «красителя». В этом случае основной вклад в формирование изображения вносит не поглощение электронов атомами образца, а их торможение, изменяющее фазы электронов. Поэтому точно сфокусированное изображение в случае «неокрашенных» образцов не содержит структурной информации. Для визуального наблюдения легких атомов необходимо сделать серию снимков с различной фокусировкой, для того чтобы с помощью анализа на ЭВМ можно было выбрать фазово-контрастные изображения, отображающие взаимное расположение легких атомов.

Для реконструкции трехмерной структуры приходится объединять информацию из многих микрофотографий. Необходимо, чтобы в каждой из них отношение величин полезного сигнала и шума было достаточно велико, что возможно только в случае высокоупорядоченных периодических структур. Именно поэтому исследование с высоким разрешением может быть выполнено только для таких объектов.

Литература

1. *Blundell T. L., Johnson L. N.*, Protein Crystallography, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1976.
2. *Bott R. R., Navia M. A., Smith J. L.*, Biol. Chem., **257**, 9883—9886 (1982).
3. *Dover S. D., Elliott A.*, J. Mol. Biol., **132**, 323—341 (1979).
4. *Dover S. D., Elliott A., Kernaghan A. K.*, J. Microsc., **122**, 23—33 (1981).
5. *Dunitz J. D.*, X-ray Analysis and Structure of Organic Molecules, Cornell University Press, Ithaca and London, 1979.
6. *Fabergé A. C., Oliver R. M.*, J. de Microscopie, **20**, 241—246 (1974).
7. *Henderson R., Unwin P. N. T.*, Nature (London), **257**, 28—32 (1975).
8. *Huxley H., Zubay G.*, Mol. Biol., **2**, 10—18 (1960).
9. *McPherson A.*, in: Methods of Biochemical Analysis, vol. 23, Glic D. (Ed.), Wiley, New York, pp. 249—345, 1976.
10. *McPherson A.*, Preparation and Analysis of Protein Crystals, Wiley, New York, 1982.
11. *Richards F. M.*, J. Mol. Biol., **37**, 225—230 (1968)
12. *Richardson W. M., Davies H. G.*, J. Cell Science, **46**, 253—278 (1980).
13. *Smith P. R., Kistler J.*, J. Ultrastr. Res., **61**, 124—133 (1977)
14. *Unwin P. N. T.*, Nature (London), **269**, 118—122 (1977)
15. *Unwin P. N. T., Henderson R.*, J. Mol. Biol., **94**, 425—440 (1975).

ПРЕДСКАЗАНИЕ КОНФОРМАЦИЙ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Б. РОБСОН (B. ROBSON, *Department of Biochemistry, The Medical School, University of Manchester, Oxford Road, Manchester M13 3PL, U.K.*)

21.1. Введение

Первые опыты успешного предсказания конформаций биомакромолекул имеют уже более чем 30-летнюю историю. Каков главный урок, полученный за это время? По-видимому, будет справедливо сказать, что на основе одних только теоретических представлений невозможно выполнить предсказание с абсолютной уверенностью. Требуется множество допущений для получения результата за разумное время при вычислениях, невозможных без применения ЭВМ. В связи с этим возникает своеобразная неопределенность: структура А предпочтительнее структуры Б, которая, однако, также считается вполне вероятной до тех пор, пока не появится серьезное возражение. Поэтому весь смысл применения теоретического подхода состоит в том, чтобы при учете экспериментальных данных можно было сделать конкретный вывод о предпочтении той или иной конформации. Именно благодаря привлечению экспериментальных данных в молекулярной биологии были сделаны важнейшие открытия: доказано существование α-спиралей и β-структуры в белках и двойной спирали в ДНК. В последнее время успешно решены и некоторые другие проблемы: направленный синтез лекарств и определение пространственного строения полисахаридов — это только два примера таких удач. В некоторых случаях, например при уточнении кристаллографических данных о белках с помощью энергетических расчетов, теоретический подход стал обычной процедурой. Образно можно сказать, что опыты по предсказанию структур биомолекул уже вышли из младенчества, хотя и не покинули еще юношеский возраст.

Исследователи, занимающиеся предсказанием молекулярных конформаций, предпочитают говорить, что конформация была рассчитана с помощью метода конформационного анализа. Данный метод позволяет как предсказывать, так и объяснять экспериментальные данные. Расчет молекулярных свойств соединений, для которых продпочтительная конформация является

далеко не единственным способом ее структурной организации, составляет основную задачу конформационного анализа. Многие молекулы не имеют фиксированной конформации, которая, строго говоря, возможна только при температуре абсолютного нуля. Молекулы ряда олигопептидов, например нейропептидов, имеют линейную довольно подвижную структуру, что делает расчет только одной конформации явно недостаточным. В этом случае целесообразно выполнить расчет усредненных свойств, например усредненной константы спин-спинового взаимодействия, величину которой можно найти из данных ЯМР-спектроскопии. Сравнение расчетных и опытных величин позволяет интерпретировать экспериментальные данные в терминах конформационных возможностей данного соединения.

Предсказание структуры белков вызывает всеобщий интерес; успехи в данной области могут иметь и социально-экономическое значение [59, 60]. Предсказательные методы в белковой инженерии считаются теперь частью обширных научных программ, затрагивающих фармацевтические, сельскохозяйственные и социальные области. Это обстоятельство стимулировало успехи специальных математических направлений, на которых останавливаться в настоящем обзоре нецелесообразно. В дальнейшем изложении главное внимание уделяется физическим основам и особенностям выполняемых вычислений. Обсуждаются также некоторые важные проблемы, связанные с аппаратурным и техническим оснащением [51, 61, 70].

21.2. Традиционные методы

Любому научному прогрессу всегда сопутствует противостояние позиций экспериментаторов, осторожно относящихся к новым концепциям, и теоретиков, которые устоявшиеся представления почти всегда рассматривают как приближенные и ограниченные. В настоящем разделе в самом общем виде излагаются некоторые предсказательные приемы, которые экспериментаторы считают достаточно хорошими и охотно используют в своих работах. А затем уже обсуждаются некоторые теоретические возражения против применения этих приемов, а также дается описание улучшенных методов.

Согласно модели твердых сфер, атомы представляют собой шары, размер которых определяется вандерваальсовыми радиусами. Допустимыми считаются конформации, в которых атомы не перекрываются. Если это условие не выполняется хотя бы для одной пары атомов, то такая конформация отвергается. Метод имеет ограниченное применение, поскольку допускает набор слишком многих конформаций и выбор какой-либо из них осуществляется чисто интуитивно. В этом подходе все взаимодействия между атомами игнорируются, за исключением ван-

дерваальсовых сил отталкивания, которым соответствует бесконечная энергия при перекрывании атомов и нулевая энергия в остальных случаях. Однако при усложнении такого подхода путем количественного учета других хорошо изученных взаимодействий, например водородных связей, оказывается удобно изучать конформации стереорегулярных молекул. Именно благодаря такому комбинированному подходу Полинг и Кори предсказали существование α-спирали и β-структуры в белках, а Уотсон и Крик — двойную спираль ДНК.

Модель твердых сфер встречается на практике при построении объемных моделей молекул. В ЭВМ (компьютер) вводят следующее выражение:

$$E(X)=\sum_{i=2}^{n}\sum_{j=1}^{i-1} e_{ij} \tag{21.1}$$

где энергия E конформации X равна сумме парных взаимодействий всех атомов молекулы; с помощью индексов i и j учитываются все атомы от первого до последнего, а e_{ij} зависит от типа атомов i и j. Энергия взаимодействия e_{ij} между атомами i и j может быть представлена разными способами, и один из них отвечает модели твердых сфер:

$$e_{ij}=\begin{cases}\infty, & \text{если } r_{ij}\leqslant R_{ij}\\ 0, & \text{если } r_{ij}>R_{ij}\end{cases} \tag{21.2}$$

Здесь e_{ij} — функция расстояния r_{ij} между центрами атомов; она имеет разрыв при $r_{ij}=R_{ij}$ (R_{ij} — сумма вандерваальсовых радиусов атомов i и j). Радиусы i и j определяются только типом атомов (алифатический углерод, кетонный кислород и т. д.). Для простых молекул обычно радиусы атомов находят из величин расстояний между атомами в кристаллической решетке. В общем случае e_{ij} представляет собой функцию потенциальной энергии, зависящую только от набора значений R_{ij}.

Уравнение (21.2) легко распространить на случай наличия водородных связей, тогда разрешенными конформациями считаются те, в которых: а) нет перекрывающихся атомов и б) присутствует максимальное число водородных связей.

Ограничения модели твердых сфер связаны с тем, что реальные атомы не являются ни жесткими, ни сферическими. Более того, в молекулах действуют также иные силы, а не только стерическое отталкивание. Как отмечалось выше, учет водородных связей совершенно необходим, чтобы модель твердых сфер реже применялась в самом примитивном виде. В молекулах существенную роль играют электростатические взаимодействия, возникающие между атомами, несущими единичный или дробный заряд, обусловленный различием электроотрицательности ато-

мов. Эти взаимодействия нельзя, однако, описать с помощью простой функции от r_{ij}, имеющей разрыв. Уместно отметить также, что модель твердых сфер вообще может применяться только потому, что области с наибольшей электронной плотностью не изменяются радикальным образом при объединении изолированных атомов в молекулу. Однако отклонение формы атомов от сферической, возможность образования водородных связей, а также дробные заряды, локализованные на атомах,— все это и есть те заметные изменения, которые происходят с атомами при их объединении в молекулы.

Модель деформируемых (мягких) сфер также основана на уравнении (21.2), но здесь e_{ij} — непрерывная функция от r_{ij}. Вообще говоря, непрерывные потенциальные функции выполняют роль не более чем аналитических соотношений, выражающих примерную зависимость изменения энергии от r_{ij}, и совсем не обязательно вкладывать какой-либо физический смысл в отдельные составляющие функции.

Тем не менее в известной степени удобно и оправданно представлять непрерывную потенциальную функцию в виде суммы вкладов, каждый из которых отвечает либо энергии вандерваальсова отталкивания, либо энергии электростатического взаимодействия, либо энергии водородной связи и т. д. Используемые потенциальные функции могут быть записаны в виде различных математических выражений; с учетом современных обозначений наиболее простое выражение для энергии e_{ij} можно записать в следующем общем виде:

$$e_{ij} = \frac{A_{ij}}{r^a_{ij}} - \frac{B_{ij}}{r^b_{ij}} + \frac{C_{ij}}{r^c_{ij}}, \quad a > b > c \qquad (21.3)$$

Здесь A_{ij}, B_{ij}, C_{ij} — параметры, зависящие от типов двух взаимодействующих атомов (алифатический углерод, кетонный углерод и т. п.). Вклад A в основном определяет потенциальную энергию модели твердых сфер [уравнение (21.2)], поскольку с увеличением показателя a зависимость от расстояния r_{ij} первого слагаемого в уравнении (21.3) быстро растет. Однако, чтобы значение функции e_{ij} с ростом r_{ij} быстрее сходилось к нулю, требуется дополнительная составляющая B, которую обычно истолковывают как вклад, отвечающий за слабые вандерваальсовы силы притяжения между взаимодействующими атомами (дисперсионные силы Лондона, вызываемые возникновением наведенных дипольных моментов). Величина этого вклада по сравнению с общей ошибкой вычислений достаточно мала, и основная роль второй составляющей — обеспечить равенство близкодействующих сил на коротких расстояниях. Третья составляющая энергии C отвечает за кулоновское электростатическое взаимодействие, обусловленное наличием дробных заря-

дов, помещаемых для простоты в центры атомов. Энергия водородной связи не представлена в виде отдельной составляющей, так как в биологических молекулах этот вид взаимодействий можно отнести к электростатическим. Поэтому при использовании уравнения (21.3) энергия и ориентация водородной связи не учитываются.

Две первые составляющие (A и B) всегда вместе присутствуют в уравнении (21.3), и вторая из них обеспечивает наличие минимума функции потенциальной энергии. Пусть e_{ij}^{vw} — энергия межатомного вандерваальсова взаимодействия [т. е. уравнение (21.3) без третьего слагаемого — электростатического вклада]. Способ определения значений A_{ij} и B_{ij} для различных пар атомов более удобен, если эти параметры представлены в виде функции e_{ij}^0 (минимальное значение e_{ij}^{vw}) и r_{ij}^0 (расстояние, при котором имеет место этот минимум). Существование минимума обусловлено тем, что $a>b$, и соответствует равновесному расположению пары атомов i и j, т. е. случаю, когда значительные силы отталкивания и слабые силы притяжения уравновешивают друг друга. Заметим, что в реальной молекуле вследствие наличия взаимодействия между остальными парами атомов такая ситуация может только случайно отвечать равновесной. Тем не менее можно записать:

$$A_{ij}=\frac{b}{a-b}\,e^0{}_{ij}(r^0{}_{ij})^a \qquad (21.4)$$

$$B_{ij}=\frac{a}{a-b}\,e^0{}_{ij}(r^0{}_{ij})^b \qquad (21.5)$$

Здесь r_{ij}^0 играет более существенную роль, чем e_{ij}^0, которая близка к 0,4 кДж/моль, и результаты расчетов мало зависят от ошибки определения последней величины. Параметр r_{ij}^0 должен, очевидно, зависеть от размера атомов и принимается равным сумме вандерваальсовых радиусов R_{ij}. Однако радиусы атомов, наблюдаемые в кристаллах, редко соответствуют равновесным из-за наличия других взаимодействий, включая электростатические, которые и обусловливают особенности данной кристаллической упаковки. Обычно, если принять $r_{ij}^0=R_{ij}$, величины r_{ij}^0 оказываются слишком заниженными; поэтому для некоторых применений были испытаны и более сложные способы определения параметров [17]. Но при всех способах расчета с использованием уравнения (21.3) достигается более правильный учет влияния размеров атомов по сравнению с моделью твердых сфер.

Последнюю составляющую энергии обычно представляют в виде

$$C_{ij}=\frac{q_iq_j}{\varepsilon} \qquad (21.6)$$

где q_i и q_j — парциальные заряды на атомах i и j, а ε — параметр, соответствующий диэлектрической проницаемости. В то время как присутствие в уравнении (21.6) произведения $q_i \cdot q_j$ представляется теоретически вполне обоснованным, использование здесь параметра ε вызывает некоторые сомнения. Скорее ε можно рассматривать просто как некоторый вспомогательный множитель, призванный привести в соответствие расчетные и экспериментальные данные, поскольку очень редко наблюдается совпадение значения ε со значением макроскопической диэлектрической проницаемости системы. При квантовомеханических расчетах, а также интерпретации данных при экспериментальных исследованиях обычно принимают $\varepsilon = 1$. До недавнего времени при относительно простых вычислениях, как правило, испытывали все значения ε от единицы до бесконечности и анализировали влияние этого параметра на получаемые результаты. В последние годы, кроме этого, учитывают несколько различных моделей растворов.

a, b и c — расчетные константы. В разных работах используются различные наборы этих констант; потенциальные функции классифицируют с помощью набора этих констант, например 12-6-1, 9-6-1, 9-6-2 и т. д. Имеются серьезные теоретические основания для выбора $b=6$ и $c=1$, хотя при учете водородной связи или в целях экономии расчетного времени (r_{ij}^2 вычисляется из значений атомных координат быстрее, чем r_{ij}) иногда принимают $c>1$. Выбор значения a вызывает большие затруднения, так как для вычисления составляющей A теоретически более оправданно использование экспоненциальной функции $A_{ij}\exp(-\mu_{ij} \cdot r_{ij})$. Однако при грубых расчетах, если значение a достаточно велико, можно этого не делать. Экспоненциальная функция используется редко, так как в нее входит дополнительный параметр μ_{ij}; кроме того, на вычисление этой функции требуется больше машинного времени. Следует отметить, что A_{ij}, B_{ij}, C_{ij} зависят от a, b, c и при любом изменении последних необходимо проводить расчеты заново.

Модели твердых сфер и модель деформируемых (мягких) сфер используют почти всегда в приближении жесткой геометрии. Это означает, что при изменении конформации и поиске минимума конформационной энергии разрешается варьировать только двугранные углы вращения вокруг одиночных связей. Длины связей, валентные и торсионные углы при двойных и тройных (или частично двойных или тройных) связях обычно считаются неизменными и равными значениям, полученным из кристаллографических данных. При этом считается, что последние отвечают равновесному состоянию, для выхода из которого требуется значительная энергия. Принимаемые ограничения оправдываются двумя практическими соображениями, во-пер-

Таблица 21.1. Параметры Хаглера — Хьюлера — Лифсона при использовании потенциальной функции 9-6-1[a]

Атом	A_{ii}, ккал/(моль·Å^9)	B_{ii}, ккал/(моль·Å^6)	C_i, ат. ед. заряда (1 ат. ед. заряда=заряд электрона)	
H	445	15	+0,11	атомы алифатических групп
C	38900	1230	(подбирают, чтобы обеспечить электронейтральность группы CH_n)	
C	12500	335	+0,46	атомы карбонильной группы
O	45800	1410	—0,46	
N	36900	2020	—0,26	атомы амидной группы
H	0	0	+0,26	

[a] Используется в уравнении

$$e_{ij} = \frac{A_{ij}}{r^9} - \frac{B_{ij}}{r^6} \times \frac{c_i c_j}{r}$$

где $A_{ij} = (A_{ii})^{0,5} \cdot (A_{jj})^{0,5}$ и $B_{ij} = (B_{ii})^{0,5} \cdot (B_{jj})^{0,5}$.

Значения параметров получены Хаглером с сотр. [17] и Хаглером и Лифсоном [15] из данных для кристаллов пептидоподобных молекул. Было показано, что приведенные значения параметров хорошо согласуются с экспериментальными данными о конформационных возможностях молекул [67] и квантовомеханическими расчетами ab initio [24]. Данные можно использовать при расчетах в приближении валентного силового поля (см. ниже). Хотя приведенный набор параметров заслуженно считается одним из лучших, в каждом конкретном случае он был уточнен в лаборатории автора и лаборатории Хаглера.

вых, расчетная задача существенно упрощается, так как сокращается число рассматриваемых конформаций, и во-вторых, выполняемые расчеты становятся нечувствительными к взаимодействиям, отвечающим за энергию валентных связей. Важнее всего, что при этом не учитывается вклад в конформационную энергию изменений длин связей и валентных углов.

21.3. Недостатки традиционных методов

В изложенном выше традиционном подходе имеется много неясностей; некоторые из них обсуждаются в настоящем разделе. Робсон с сотр. [67] выделил наиболее серьезные проблемы, которые следует решить уже в ближайшие годы.

1) Необходимо получить более удачные потенциальные функции, которые должны содержать более обоснованные параметры и удовлетворять большему числу тестов.

2) Следует перейти к нежесткой геометрии с варьируемыми длинами связей и, главное, варьируемыми валентными углами.

3) Поскольку биопептиды действуют в воде, а в большинстве экспериментов используются другие, весьма разнообразные

растворители, нужно разработать методы, учитывающие влияние среды.

4) Существующие методы предсказывают конформации с наименьшей потенциальной энергией $E(X)$, а наблюдаемые в действительности конформации имеют наименьшую свободную энергию $F(X)$. Поэтому предсказательные методы должны рассчитывать именно величину свободной энергии, что означает необходимость учета энтропийной составляющей.

5) Рассмотренные методы основаны главным образом на поиске конформации с наименьшей энергией путем рассмотрения большого числа вариантов, что трудно выполнимо для сложных молекул типа белков. Действительно, даже автоматическая (машинная) минимизация, предназначенная для поиска наименьшего значения функции типа $E(X)$, мало пригодна для этой цели, так как соответствующая поверхность потенциальной энергии содержит много локальных минимумов, в которых поиск останавливается. Таким образом, для сложных молекул предстоит преодолеть проблему множественности минимумов.

И наконец, изучение непептидных молекул обязывает нас пополнить список проблем, требующих решения. Дело в том, что обычно используемые потенциальные функции описывают взаимодействия между центрами атомов, совпадающими с положениями ядер. Однако в атомах имеются некоторые электроны, например электроны неподеленных пар, для которых характерно, что электронная плотность локализована на некотором расстоянии от ядра. Тем самым форма некоторых типов атомов далека от сферической. В этом и кроется сущность данной проблемы, которая важна и в случае изучения пептидных молекул. Для преодоления подобного затруднения может служить метод орбитального силового поля, предложенный Платтом и Робсоном [51].

21.4. Арсенал современных теоретических методов

Упомянутые выше затруднения, связанные с применением упрощенных методов, вполне преодолимы благодаря наличию мощных приемов, имеющихся в распоряжении теоретиков. Схема, изображенная на рис. 21.1, дает представление об этих приемах, а также о тех физических принципах, которые лежат в основе рассматриваемых методов. Эти принципы представлены в виде принятых приближений, которые перечислены в вертикальной колонке левой части рис. 21.1. Наиболее ортодоксальные теоретики, такие, как Дирак, считают, что каждая проблема должна решаться строго, даже если нет возможности за разумное время получить практически значимый результат. В действительности нет, однако, какого-либо строгого универсального метода, а су-

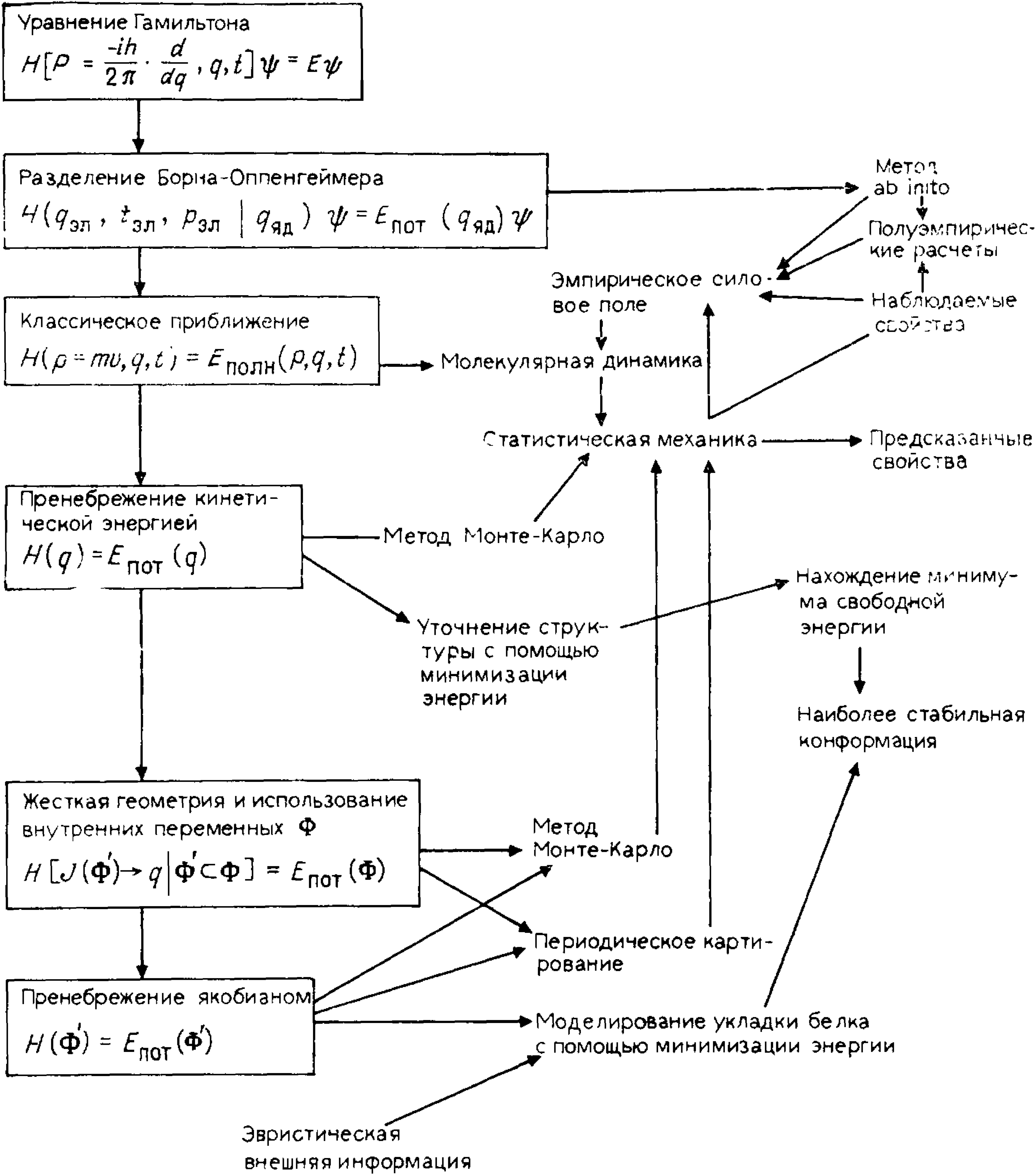


РИС. 21.1. Взаимосвязи между различными физическими методами расчета.

ществуют несколько или по крайней мере один метод, позволяющий выйти на нужный уровень приближения. Тем не менее теоретики продолжают поиски более точных методов, чтобы прикладные задачи можно было решать с еще лучшим приближением. Важно уметь увидеть различие между «точным» решением и доступным с помощью существующего метода, тем более, что очень дорогие на сегодня приемы станут вполне рутинными завтра. Во многом это зависит от успехов в совершенствовании вычислительной техники.

21.4.1. Квантовомеханические методы

Использование квантовомеханических подходов предполагает строгое соблюдение физических законов. Как неудивительно, но расчеты с помощью наиболее строгих квантовомеханических методов приводят к величинам, сравнимым с экспериментальными данными, хотя, к сожалению, такие расчеты пока выполняются только в случае отсутствия необходимого количества экспериментальных данных.

Отправной точкой схемы на рис. 21.1 является известное утверждение, что все свойства системы могут быть рассчитаны с помощью уравнения Гамильтона:

$$H\Psi = E\Psi \qquad (21.7)$$

где Ψ — волновая функция, E — полная энергия системы, а H — оператор Гамильтона.

Решение уравнения относительно волновой функции Ψ дает вероятность нахождения частицы в положении q в момент времени t; а также наблюдаемую энергию системы относительно оператора Гамильтона. Функция этого оператора в уравнении достаточно проста: как всякий оператор, он указывает способ превращения одних функций в другие (другой оператор, например знак дифференциала, — действие дифференцирования). Приведем классический пример. Пусть в выражение для энергии системы надо подставить вместо момента частицы оператор $(-ih/2\pi)\cdot(d/dq)$. Оператор гамильтониан как раз и содержит выражение подобного типа. Уравнение (21.7) имеет много решений, но только отдельные из них несут физический смысл. Каждое из них отвечает состоянию системы с определенной вероятностью. При решении уравнения Гамильтона наибольшие затруднения вызывает необходимость учета не только влияния данной частицы на все другие частицы системы, но и влияния последних на поведение этой частицы. Для математической оценки такого влияния приходится вводить первое приближение в виде теории возмущений, которая ра-

нее применялась для учета взаимного влияния планетарных орбит.

Следующий весьма важный момент для практического конформационного анализа связан с принципом разделения Борна — Оппенгеймера. Последний означает, что энергию системы целесообразно относить к строго фиксированной конфигурации ядер атомов без учета расположения электронов. Тем самым совокупность положений ядер определяет конформацию молекулы, которой можно однозначно приписать значение конформационной энергии. Согласно рис. 21.1, для расчета энергии применим метод ab initio, но на практике, однако, такие расчеты возможны только для очень простых химических молекул. На деле для получения квантовомеханическим методом даже приблизительного значения энергии требуется пройти несколько этапов, каждый из которых подразумевает различные степени приближения и упрощения. В целом мы остаемся на том же самом уровне приближения, т. е. все упрощения носят квантовомеханическую природу или являются аналитическими приближениями громоздких вычислений. В любом случае мы оцениваем энергию простой конформации, образовавшейся вследствие электронно-ядерного разделения Борна — Оппенгеймера. Теперь мы можем рассмотреть боковые ответвления на рис. 21.1.

Для того чтобы достаточно точно рассчитывать свойства более сложных молекул, включая простые пептиды, необходимо привлечь два дополнительных принципа. Один из них известен как «линейная комбинация атомных орбит». Предполагается, что атомные орбиты плохо передают свойства молекулы; более удачное, хотя и более сложное описание может быть получено сложением атомных орбит с различными весовыми коэффициентами. Согласно второму, вариационному принципу, допустимы все решения, но наиболее вероятно решение, отвечающее конформации с наименьшей энергией. Поэтому для поиска решения с наименьшей энергией варьируют и коэффициенты, и форму атомных орбит.

Набор атомных орбит имеет вид параметров для трехмерных функций Гаусса или подобных им функций Слейтера. Для представления каждой атомной орбиты обычно используют также несколько дополнительных функций, и, чем их больше, тем проще с помощью компьютера найти решение, отвечающее наименьшей энергии. Набор функций, описывающих орбиты, образует базисный набор (минимальный или расширенный). Расширение базисного набора предполагает использование большего числа орбитальных функций, дающих компьютеру больше возможностей для изменения состояния системы и поиска решения, отвечающего более низкой конечной энергии.

Считается, что каждый расчет, приводящий к более низкой энергии, обеспечивает при этом и более надежный результат. При достаточном расширении базисного набора результаты расчетов полностью независимы от начальной точки, что и соответствует названию ab initio. На практике это, однако, требует очень больших затрат расчетного времени. Например, для расчета одной конформации из 20—30 атомов может потребоваться около часа работы ЭВМ. Отметим также, что выбор базисного набора означает только определенный уровень приближения; рассматриваемый метод можно считать независимым от параметров, как и должно быть при расчетах типа ab initio.

Вычисление некоторых интегралов — этап, требующий много расчетного времени. В то же время полуэмпирические квантовомеханические расчеты позволяют сократить вычисления с помощью введения ad hoc ряда вспомогательных параметров. Подобные расчеты выполняются гораздо быстрее, но дают менее надежные результаты. Применяемые при вычислениях такого рода полуэмпирические методы носят названия, составленные из первых букв полного наименования: (EXT — «расширенная теория Хюккеля», CNDO — «Полное Пренебрежение Дифференциальным Перекрыванием», PCILO — «Пертурбационные Конфигурации Взаимодействующих Локальных Орбит» и т. п.). Метод PCILO привлекателен тем, что позволяет сохранять информацию о возбужденных состояниях, а также рассчитывать вклад дисперсионных сил притяжения Получение подобных данных методом ab initio потребовало бы слишком длительных расчетов. Правда, следует отметить, что вклад этих взаимодействий в конформационную энергию весьма мал (~0,4 кДж/моль на пару взаимодействующих атомов) и на порядок меньше общей ошибки вычислений.

Программы для подобных вычислений доступны в виде стандартных пакетов. Типичными программами для вычислений методом ab initio являются пакеты GAUSSIAN70 и ATMOL/3, а программы для полуэмпирических расчетов известны под различными названиями в зависимости от характера применяемых приемов. Перед выполнением расчетов обычно задают декартовы координаты ядер, но в некоторых программах возможен расчет исходных координат и на основе представления геометрии системы через длины связей, валентные и торсионные углы. Для достижения наименьшей конформационной энергии обычно выполняют вычисления для серии конформаций, каждая из которых немного отлична от другой. Полученные результаты возможно представить в виде потенциальной поверхности табличным или графическим образом, и тем самым задать энергию как функцию конформации.

В ряде программ предусмотрено автоматическое выполнение ряда вычислений, обеспечивающих нахождение на потенциальной поверхности точки с наименьшей энергией. В тех случаях, когда поиск выгодных конформаций ведется при фиксированных длинах связей и валентных углах, расчет носит название «оптимизации геометрии». Множество конформаций определяется при этом набором торсионных углов.

Следующим уровнем приближения при выполнении расчетов потенциальных поверхностей является замена квантовомеханических соотношений аналитическими функциями, т. е. использование потенциальных функций, о чем шла речь в разд. 21.2. Параметры этих функций обычно подбирают, исходя из экспериментальных данных.

21.4.2. Метод молекулярной динамики

Применение принципа Борна — Оппенгеймера позволяет рассчитывать квантовомеханическим методом энергии отдельных конформаций. Реальное содержание этого принципа состоит в возможности разделения движения ядер и электронов и выделении вкладов кинетической энергии каждого типа частиц. При выполнении энергетических расчетов для конкретных конформаций мы обычно пренебрегаем кинетической энергией ядерного движения. Можно ли оценить этот вклад?

Вообще говоря, при квантовомеханическом подходе можно рассматривать и изменения молекулярных систем во времени, но на деле такие вычисления выполнить очень трудно. Практическое представление кинетической энергии связано с дальнейшим упрощением, согласно которому система подчиняется законам классической механики, а атомы ведут себя как макроскопические объекты. Поэтому моменты ядер представляют не в виде $p=(-ih/2\pi)\cdot(d/dq)$, а как произведения массы и скорости $p=mv$. Тогда оператор Гамильтона не действует на волновую функцию, а сам становится функцией, значением которой является энергия системы. Оператор трансформируется в классический гамильтониан. Энергия системы не является больше дискретной величиной, квантовомеханическая неопределенность исчезает, а движение ядер подчиняется закону Ньютона. Конечно, ядерные и электронные движения квантуются, но пренебрежение этими движениями оказывает влияние только на колебания химических связей. Даже при классическом описании движения ядер возможно квантовомеханическим методом рассчитать потенциальную энергию каждой конформации, что, однако, требует чрезмерно большого машинного времени. В данном случае квантовая механика не имеет каких-либо преимуществ, и расчет потенциальной энергии каж-

дой конформации выполняют с привлечением эмпирических потенциальных функций. Разумеется, при выведении аналитических соотношений по-прежнему используются квантовомеханические подходы.

Важным результатом расчетов методом молекулярной динамики с помощью потенциальных функций является возможность определения сил, действующих на каждую частицу. Это просто выполнить, вычисляя производную от энергии как функцию от координат. Зная массу ядер, можно по закону Ньютона (сила = масса·ускорение) вычислить ускорение и далее координаты, момент и кинетическую энергию каждой частицы через короткий фиксированный отрезок времени. В отличие от традиционных методов поиска наиболее выгодных конформаций с наименьшей энергией исследователь не может в данном случае производить свободный просмотр конформаций. Применяемый алгоритм основан на законе Ньютона, а выбор очередной конформации происходит вынужденным образом. Простота закона Ньютона определяет и простоту основного алгоритма, но на практике применяют модифицированные алгоритмы, обеспечивающие нужную скорость и точность вычислений. Наиболее популярный из них [2] отличается простотой, скоростью и надежностью. Помимо задания начальной конформации и вида потенциальных функций (для численного решения уравнений), алгоритм требует знания начальных скоростей частиц и ограничения отрезка временного интервала. Слишком большой интервал экономит расчетное время, но не обеспечивает плавного изменения потенциальной и кинетической энергии. Начальные скорости частиц необходимо задавать, так как средняя кинетическая энергия определяет температуру системы. Нет смысла выполнять вычисления при абсолютном нуле или при очень высокой температуре, когда большая часть энергии стартовой конформации превращается в кинетическую энергию системы.

Несмотря на пренебрежение квантовомеханическими эффектами, метод молекулярной динамики связан с большими затратами машинного времени. Для описания последовательности событий на временном интервале в 10^{-10} с требуется несколько минут рабочего времени процессора. Процесс сворачивания реальной белковой глобулы занимает ~ 1 с, а моделирование такого процесса может потребовать несколько сотен лет, что, разумеется, не имеет смысла для целей предсказания. Тем не менее, подобный прием применим для изучения колебательных процессов в молекулах «малых» белков [36] и поведения простых пептидов в водной среде [68].

Поскольку предпочтительная структура молекулы отвечает равновесной, история ее предшествующих превращений не име-

ет значения для целей предсказания. Интересно, однако, что метод молекулярной динамики позволяет строго оценивать величину свободной энергии, которая зависит от степени подвижности молекулы вблизи минимума на поверхности потенциальной энергии (эта поверхность описывается функцией конформационных параметров). Пока еще нельзя с уверенностью утверждать, соответствует ли нативная структура белка самому глубокому минимуму энергии или промежуточному минимуму, достижимому за разумное биологическое время. В любом случае исследование кинетических изменений молекулы служит полезным инструментом при предсказании нативной структуры.

21.4.3. Метод Монте-Карло

Учитывая, что наибольший интерес вызывает равновесное состояние, а не кинетический механизм достижения равновесия, кинетической составляющей энергии часто пренебрегают за исключением той ее части, которая присутствует в виде kT.

Пренебрежение кинетической энергией позволяет считать ядра системы безынерционными, и благодаря этому возможен произвольный выбор конформаций при расчете поверхности потенциальной энергии. Известен еще один подход, напоминающий метод молекулярной динамики, называемый методом Монте-Карло. Смысл решаемой задачи, а также организация хранения и анализа данных одинаковы для обоих методов. В методе Монте-Карло для передвижения по поверхности потенциальной энергии применяется способ, в основе которого лежит генерация случайных чисел. При этом соблюдают основной принцип, согласно которому последовательность исследуемых конформаций носит действительно случайный характер, а вычисления продолжаются до тех пор, пока не будет достигнут результат достаточной степени точности. В результате расчетов может быть получена любая из интересующих исследователя физических характеристик, например свободная энергия.

В современных компьютерах имеются программные средства генерации случайных чисел, применяемых для получения новых конформаций, каждая из которых образуется путем малых случайных возмущений предыдущей конформации. Генерируемые случайные числа являются в действительности «псевдослучайными», и алгоритм образования таких чисел использует какое-либо стартовое число. Полученное случайное число в свою очередь служит аргументом при генерации очередного случайного числа. Тем самым, если алгоритм не привязать специально к компьютерным часам или числам, имеющимся в

оперативной памяти, одинаковое стартовое число будет всякий раз воспроизводить одни и те же результаты, что иногда даже желательно, так как появляется возможность повторения вычислений. Это, однако, не означает, что имеется какая-либо связь между генерируемыми числами, помимо того, что все они — случайные величины. Все же всегда существует опасность, что алгоритм случайных чисел в какой-то момент вновь воспроизведет стартовое число и вся последовательность чисел будет повторена. Поэтому алгоритм и стартовое число должны быть подобраны так, чтобы период цикличности был бы достаточно велик. Тем не менее, если в применяемой программе такая опасность сведена к минимуму, имеется все же вероятность трудноуловимой взаимосвязи получаемых результатов.

Несмотря на стремление исключить какие-либо закономерности в исследуемой выборке, следует признать, что метод Монте-Карло предполагает выполнение определенных требований. Разумеется, точность и надежность результатов не должны зависеть от этих требований, и их влияние каким-либо образом компенсируют. Оправданием для введения ограничений является нецелесообразность рассмотрения слишком большого числа высокоэнергетических конформаций, так как исследуемая выборка должна быть богата конформациями низкой энергии. Способ введения ограничений составляет сущность метода Монте-Карло, и без них метод был бы не только тривиальным, но и не имеющим практического смысла. В зависимости от используемых конкретных приемов известны различные модификации метода Монте-Карло: ограничения полимерных звеньев, расчет по Метрополису и др. Подход, предложенный Метрополисом настолько распространен, что его часто ошибочно отождествляют с методом Монте-Карло, и в настоящем разделе этот подход будет рассмотрен подробнее. Методика «ограничений полимерных звеньев» наиболее популярна при изучении свойств клубкообразной формы полипептидов [52, 53]. Такое применение связано с выработкой конформаций, отвечающих полностью развернутым денатурированным полипептидам.

Существо алгоритма Метрополиса [38] состоит в следующем. Положение частиц системы меняют в обозначенных пределах относительно исходных позиций. Рассчитывают потенциальную энергию новой конформации и принимают за ΔE разность потенциальных энергий новой и старой конформаций. Следует иметь в виду, что речь идет не о конформации одной молекулы, а о конфигурации целой системы частиц, состоящей из молекул пептида и воды. Если $\Delta E<0$, то новая конформация принимается без оговорок. Если же $\Delta E>0$, то генерируют случайное число в интервале от 0 до 1 и сравнивают его с величиной $e^{-\Delta E/kT}$. В случае превышения этого порога новая

конформация принимается, а в противном случае отвергается и в качестве исходной вновь принимается прежняя конформация.

Важная особенность подхода Метрополиса состоит в способе расчета средних свойств (т. е. усредненных по всем конформациям) объекта. Для этого достаточно сумму по всем генерированным конформерам разделить на полное число конформеров. Надо заметить, что в процедуре усреднения участвуют только «успешно генерированные» конформации. Испробованные, но отвергнутые конформеры не учитываются, а конформеры, к которым осуществляется возврат после неудачного шага, учитываются вновь. Этот метод не является обычным для статистической механики (см. ниже) и справедлив только для процедуры Метрополиса, составляя его неотъемлемую часть. Различие состоит в том, что обычно рассчитывают взвешенное среднее, употребляя в качестве весовых коэффициентов экспоненциальные множители вида $e^{-E/kT}$. В методе Метрополиса частота успешно генерированных конформеров оказывается пропорциональной экспоненциальным весовым коэффициентам, благодаря чему и обеспечивается корректность получаемого усредненного свойства. Основная ценность метода Метрополиса заключается в том, что алгоритму приданы статистические свойства и обеспечена его эргодичность, т. е. существование всех возможных конформеров правомерно.

Изложенный метод оказался особенно удачным при исследовании водных растворов пептидов и белков. Важно отметить при этом, что число конформационных параметров скорее лимитируется расчетным временем, а не сложностью рассматриваемой системы. Поэтому, если молекула белка не меняет конформации, то учет ее влияния на окружающую среду не очень усложняет машинные расчеты.

Подходящей тестовой системой является гидратированный кристалл, так как местоположение некоторых молекул воды можно сравнить с кристаллографическими данными. Интересны в этом отношении работы по изучению кристаллов лизоцима и гидратированных кристаллов циклического дипептида [16, 21]. На этих примерах можно видеть, как обходить трудности, связанные с краевыми эффектами на границе системы. В этих расчетах удается учитывать присутствие 350—400 молекул воды, но даже такое количество недостаточно, чтобы образовать поверхностную пленку белка в вакууме. Эта поверхность не может быть учтена в расчетах изолированной единичной ячейки гидратированного кристалла, контактирующей с аналогичными соседними ячейками, что привело бы к заполнению всего пространства. Однако свойства молекул воды в каждой единичной ячейке копируются свойствами экви-

валентных молекул воды во всех остальных ячейках, и каждая молекула, покидающая ячейку в ее левой нижней части, замещается новой в правой верхней части ячейки. Таким образом, вводятся «периодические граничные условия».

Хотя рассмотренные периодические граничные условия особенно наглядны в случае единичных кристаллических ячеек, они могут успешно переноситься и на растворы. В этом случае необходимо определить размер единичной ячейки и расстояние, до которого ведется расчет энергии (пороговое расстояние) и учитывается влияние дальнодействующих сил. Хаглер с сотр. [22] методом Монте-Карло изучили поведение N′-метиламида N-ацетилаланина в водном растворе. Данная молекула представляет интерес как классическая модель обладающего химическими признаками полипептида. Эта молекула имеет достаточное число степеней свободы (5) для существования различных конформаций. В растворе оказывается возможным учитывать только влияние воды на предпочтительность конформаций пептида и пренебрегать влиянием растворенного пептида на структуру воды. В результате выполненных расчетов были получены следующие данные о поведении N′-метиламида N-ацетилаланина в растворе:

1) как и следовало ожидать, молекулы воды прикреплены к пептидным группам водородными связями и, по-видимому, оказывают влияние на конформационные возможности пептидной молекулы;

2) влияние пептида на поведение воды ограничивается пространством, занимаемым первой гидратной оболочкой;

3) полярные растворители имеют тенденцию стабилизировать такую конформацию пептидной молекулы, которая характеризуется наибольшим дипольным моментом. В присутствии полярных растворителей устойчивость конформаций с внутримолекулярной водородной связью, но характеризующихся низким дипольным моментом, объясняется стерическими факторами. Интересно, что перечисленные результаты свидетельствуют в пользу хорошо известных моделей поведения растворителей, а именно: а) надмолекулярной, б) модели сольватных оболочек и в) модели реакционного поля. Каждая из этих моделей односторонне отражает особенности процесса сольватации. В данном случае «точные» вычисления хорошо демонстрируют эффективность расчетных приближенных методов. Конечно, с помощью вычислительных методов пока еще невозможно преодолеть возникающие трудности, так как расчеты свободной энергии, например системы пептид — растворитель, занимают десятки часов машинного времени.

21.4.4. Статистическая механика

Методы статистической механики, применяемые и в термодинамике, позволяют выполнить расчеты средних свойств системы, принимающей многочисленные конфигурации при температурах, отличных от абсолютного нуля. Методы молекулярной динамики, метод Монте-Карло, а также методы прямых расчетов энергий различных конформаций можно аппроксимировать получением статистических выборок. Применение методов статистической механики позволяет проводить анализ выборочных данных. Следует отметить, однако, что в отдельных случаях, например в методе Метрополиса, способ составления выборки физической величины и статистический анализ неотделимы друг от друга.

В действительности усреднение методом статистической механики идентично обычному усреднению. Если каждой конформации X отвечает некоторое физическое свойство $V(X)$ и вероятность реализации этой конформации $P(X)$, то ожидаемое среднее $\bar{V}$ равно

$$\bar{V} = \int P(X) \cdot V(X) \cdot dX \tag{21.8}$$

По законам статистической механики вероятность $P(X)$ пропорциональна весовому коэффициенту Больцмана $e^{-H/kT}$:

$$P(X) = Q^{-1} \cdot e^{-H/kT} \tag{21.9}$$

где H — полная энергия системы, вычисляемая через классический гамильтониан и содержащая в качестве составляющей кинетическую энергию:

$$H = H(p, q) = W(p) + E(q) \tag{21.10}$$

Здесь W — кинетическая энергия, зависящая от моментов ядер p, а E — потенциальная энергия, зависящая от координат ядер q и тем самым от конформации X. Q — функция распределения, значение которой определяет все термодинамические свойства системы. Например, свободная энергия E системы следующим образом связана с функцией распределения:

$$F = -kT \ln\alpha \int\int e^{-H/kt} dpdq = -kT \ln \alpha Q \tag{21.11}$$

Коэффициент α зависит от числа неразличимых и поэтому взаимозаменяемых частиц [30], что часто приводит к недоразумениям. К счастью, влияние коэффициента α несущественно, если рассматриваются относительные свободные энергии одной и той же молекулы.

Главное отличие метода молекулярной динамики от метода Монте-Карло состоит в пренебрежении в последнем случае составляющей кинетической энергии $W(p)$. Это пренебрежение приводит к введению конфигурационной функции распределения Z, что допустимо в равновесных условиях.

$V(X)$ может характеризовать любое физическое свойство, которое зависит от конформации X исследуемой системы, например это может быть константа спин-спинового взаимодействия в спектре ЯМР, набор каких-либо значений, например спектр кругового дихроизма в заданном интервале длин волн, или матрица Флори, служащая в теории клубкообразных полимеров для определения положения каждой полимерной цепи относительно предшествующего положения. Важными термодинамическими параметрами являются энтальпия (в предположении, что изменения объема не происходит) $V = E$ и энтропия $V = k \ln P(X)$, которая означает количество информации, соответствующей конформации X.

21.4.5. Минимизация

Можно сказать, что минимизация энергии является оценочной процедурой, предназначенной для поиска наиболее вероятной конформации. Подобный поиск связан с минимизацией энергии, т. е. нахождением наиболее вероятной конформации, обладающей наименьшей энергией.

Строго говоря, при поиске самой выгодной конформации должна вычисляться свободная энергия системы. На практике, однако, делается допущение, что минимум на поверхности потенциальной энергии соответствует минимуму на поверхности свободной энергии. Вслед за этим полагают также, что самый глубокий минимум потенциальной энергии соответствует и самому глубокому минимуму свободной энергии. Если в последнем допущении нет достаточной уверенности, то вычисляют и сравнивают значения свободной энергии во всех локальных минимумах. Различные методы расчета свободной энергии однозначно свидетельствуют в пользу заключения, что размытый минимум потенциальной энергии может отвечать более низкому минимуму свободной энергии. Разумеется, разность значений потенциальных энергий обоих минимумов не должна быть слишком большой. При расчетах свободной энергии системы находят локальную функцию распределения Z (см. выше) методом интегрирования в окрестностях минимума. При расчетах свободной энергии используют также значения вторых производных и колебательных частот (см., например, [20]). Во всех случаях при оценке свободной энергии привлекают представления статистической механики для анализа минимумов на поверхности потенциальной энергии. Тем не менее этот подход в пептидном конформационном анализе достаточно нов и применяется пока еще редко. Следует отметить, что теоретически возможно рассчитать свободную энергию вблизи любой точки потенциальной поверхности, а не только вблизи минимума, и для этого можно использовать специальную компьютерную программу, в которой реализован метод минимизации свободной энергии.

Минимизация энергии как функции конформации используется весьма часто. Эта процедура лежит в основе машинного моделирования самосборки молекулы белка и энергетического уточнения белковых структур, установленных рентгеноструктурным методом. Известно большое число доступных программ для выполнения процедур минимизации при вычислениях; большинство таких программ позволяют пользователю самому составить функцию расчета энергии по конформационным параметрам. Разнообразие программ отражает богатый спектр математических приемов, применяемых для поиска минимума

значений функций. В целом, однако, эти приемы распадаются на две группы.

Первую группу образуют градиентные методы. Хотя главным условием является нахождение точки, в которой первые производные по конформационным переменным равны нулю, а вторые производные больше нуля, некоторые методы не требуют явного вычисления производных. Эти методы можно рассматривать как семейство процедур, отличающихся способом преобразования $E_{i+1} - E_i$ (здесь i и $i+1$ отвечают соседним точкам конформационного пространства) для вычисления производных в точке i и выбора конформации X_{i+1}. Метод наискорейшего спуска является одним из самых простых, но пользуется большой популярностью в конформационных расчетах в связи с хорошей сходимостью результатов. Недостатком метода считается его невысокая скорость. Метод Ньютона — Рафсона отличается большей сложностью и требует вычисления вторых производных, тем не менее в настоящее время подобные методы используются достаточно часто. Метод Флетчера — Ривса позволяет обходиться без вычисления вторых производных, а информацию о кривизне энергетической поверхности получают с помощью использования квадратичных форм приближения. Методы Давидона [9] и Флетчера — Пауэлла [11] используют преимущества как процедуры Ньютона — Рафсона, так и процедуры Флетчера — Ривса. Перечисленные методы достаточно эффективны, но имеют недостаток: поиск прекращается в любом из локальных минимумов. Действительно, выход из минимума невозможен ввиду принципиальных особенностей алгоритмов указанного типа.

Алгоритмы минимизации второго типа представлены овражными методами и могут быть хорошо проиллюстрированы на примере симплекс-процедуры. Она успешно работает в случае необходимости минимизации энергии как функции углов вращения, а не координат x, y и z. Симплекс — многогранник с $n+1$ вершиной в n-мерном пространстве — анализирует значения функции во всех вершинах и перемещает вершину с самой высокой энергией в точку с более низкой энергией. Для этого в симплекс-процедуре предусмотрены операции отражения, расширения или сжатия многогранника и движения пробной точки относительно центроида остальных точек. По-видимому, градиентные методы поиска можно сравнить с поведением мяча, перемещающегося вниз к подножию холма, а симплекс-метод — с поведением слепого осьминога, нащупывающего свою нору в коралловом рифе. Разумеется, симплекс-метод имеет также недостатки, но в целом его следует считать весьма надежным. Этот метод работает и при наличии точек разрыва в производных или в самой функции; он хорошо при-

способлен для учета различных дополнительных внешних условий, налагаемых на конформационные переменные или на значения энергии, а также на другую функцию конформационных переменных. Более того, этот алгоритм позволяет преодолевать мелкие минимумы, если пробная точка попадает в район с более низкой энергией. Вероятность такого «прыжка» зависит от глубины и профиля встретившегося минимума, ширины энергетического барьера и от значений управляющих параметров симплекс-процедуры. При условии что новая вершина генерируется на значительном расстоянии от центроида многогранника, вероятность встречи нового минимума заметно возрастает. В зависимости от реальных обстоятельств симплекс-процедура может быть модифицирована с целью большей эффективности в решении частных проблем (например, комплекс-процедура). Один из недостатков симплекс-метода — высокие затраты машинного времени для получения надежных результатов.

С одной стороны, градиентные методы быстро находят локальные минимумы, но они испытывают затруднения, если функция ведет себя недостаточно просто (например, имеет точки разрыва). С другой стороны, симплекс-метод может работать с большинством функций и не останавливается в локальных минимумах, что увеличивает вероятность обнаружения глобального минимума. Неоднократно высказывалось мнение о целесообразности объединения обоих методов в работах, посвященных строению пептидов и белков. Так, Робсон и Осгаторп [62] использовали двойную минимизацию, при которой градиентный метод переключался на симплекс, если происходила остановка в локальном минимуме или встречалась трудная точка, и наоборот, происходил возврат к градиентному методу при обнаружении нового минимума. Переключение происходит автоматически с помощью диагностических переменных, вычисляемых в каждом из алгоритмов в зависимости от текущего значения сходимости.

Такой подход позволяет обойтись без введения специальных алгоритмов преодоления локальных минимумов (см., например, метод термализации [33]).

21.4.6. Жесткая геометрия

Вычисления по методу Монте-Карло и нахождение энергетических минимумов могут быть выполнены в декартовых координатах, однако подобным образом поступают только в специальных случаях, например при энергетическом уточнении конформации молекул. Чаще всего принимают, что изучаемое соединение имеет жесткую геометрию и меняться могут только

углы вращения вокруг одиночных связей, тогда как остальные параметры (длины связей, валентные углы и пр.) считаются фиксированными. Естественно, что подобное допущение позволяет экономить много машинного времени, так как поиск на потенциальной поверхности сильно упрощается. Более того, уменьшение числа переменных несет и дополнительные практические выгоды.

Особенность указанного подхода состоит в отсутствии простой связи новой системы внутренних координат с действительными декартовыми координатами молекулы. Это значит, что поиск в пространстве углов вращения (случайным образом или с помощью постоянных приращений) не эквивалентен поиску в реальном конформационном пространстве, определяемом декартовыми координатами всех атомов. Математическая связь частных производных по декартовым переменным и внутренним координатам обеспечивается с помощью элементов специального определителя (якобиана), который можно считать корректировочным множителем при выполнении вычислений. На практике якобианом почти всегда пренебрегают, за исключением тех случаев, когда его вычисление достаточно просто, например при учете вращения молекул воды в случае моделирования методом Монте-Карло поведения растворов. Можно предположить также, что пренебрежение якобианом вполне оправдано для молекул с глубоким минимумом потенциальной энергии и в особенности в случаях, когда интерес представляет только минимальное значение функции (например, в процедуре минимизации).

Приближение жесткой геометрии не используют обычно при расчетах методом молекулярной динамики, когда переменными являются декартовы координаты атомов. Такое допущение в принципе несовместимо с основами метода, хотя ограничения на длины связей и на некоторые другие величины значительно экономят машинное время. На практике возможно пользоваться ограничениями, хотя их учет не простое дело. Подобные ограничения, естественно, несколько нарушают реальное описание динамического поведения системы, но, по-видимому, вносимые погрешности уступают общей ошибке, обусловливаемой рядом других причин.

21.4.7. Периодическое оценивание и картирование

Периодическое оценивание энергии — это процедура, в которой используется жесткая геометрия молекул, а вычисления производятся при изменении углов вращения на равные промежутки. В каждой точке пространства вычисляют энергию системы, и полученные значения заносят в специальный двумерный массив, предназначенный для удобства дальнейшего визуального представления информации.

Для облегчения такого представления табличные значения преобразуют в карту, т. е. в контуры изоэнергетических точек. Если в молекуле имеется более двух торсионных углов, то

остальные углы рассматривают как менее важные по сравнению с минимизируемыми углами. При необходимости энергия молекулы в каждой точке пространства, определяемого двумя углами карты, может быть минимизирована и как функция от остальных углов, не участвующих в построении карты.

Поскольку карта представляет наглядный срез потенциальной поверхности, выполненный с разрешением, задаваемым интервалами между точками, ее можно использовать для разных целей. Можно, например, быстро найти конформации с наименьшей и наибольшей энергией, а также определить форму минимумов. Значения энергий, наносимых на контур, могут быть использованы для вычисления ряда величин методами статистической механики: средних значений конфигурационной энтропии, спектров кругового дихроизма и т. д. Нанесение контуров на карту связано, конечно, с интерполяцией значений энергии между точками, что существенно при усреднении физических свойств в условиях ограниченного числа точек оценивания. Такое усреднение должно учитывать и вышеупомянутый якобиан, но подобный учет выполняют достаточно редко. Если же главная цель — расчет, а не просто просмотр результатов, то совсем неважно, взят ли одно- или двумерный массив данных. Этот массив можно использовать для автоматического поиска минимума энергии, что в данной ситуации означает минимизацию с помощью «исчерпывающего периодического сканирования» (т. е. просмотра всей энергетической поверхности). Если массив данных соответствует потенциальной поверхности мономерного звена статистического клубка полимера, то используя приближение статистической теории полимеров, можно рассчитать гидродинамические и светорассеивающие свойства исследуемой молекулы.

Периодическое оценивание энергии служит не только для получения карт изолиний. Таким образом можно найти и приближенные значения энергии в любой точке потенциальной поверхности, охваченной процедурой минимизации.

21.4.8. Эвристические методы

Обычно, «эвристическим» считают прием, который облегчает поиск решения сложной задачи и сокращает время, требующееся для получения результата. Подобные приемы, позволяющие экономить машинное время, применяют для предсказания конформации белков. Эвристические методы не предполагают введения специальных допущений, как, например, в методе Метрополиса или алгоритмах минимизации энергии. В настоящем разделе рассмотрены приемы, которые не приводят к изменению потенциальной поверхности, но используют априорные ограничения в пространстве конформационных параметров.

Принципиальная трудность в предсказании структуры белков состоит в существовании большого числа локальных минимумов; применение же эвристических приемов направлено как раз на преодоление проблемы множе-

ственности минимумов. Введение ограничений позволяет исключить из поиска области конформационного пространства, не содержащие глобального минимума a priori, или, наоборот, вести поиск в тех областях, где содержится интересующее исследователя решение.

В пионерской работе Левитта и Варшела [33] по моделированию процесса самоорганизации панкреатического трипсинового ингибитора было предложено упрощенное представление белковой молекулы. Это было задумано с целью сглаживания несущественных деталей исследуемой потенциальной поверхности, включая локальные минимумы. Естественно, такой подход можно считать за применение своеобразных потенциальных функций, что эквивалентно принятию заведомо грубого дальнейшего приближения. Подобный прием не является в полной мере эвристическим, и переход на уровень столь сильного упрощения представляет собой весьма специфическое нововведение в исследовании процесса самоорганизации белков. Следует также иметь в виду, что предложенная примитивная модель белка в данном случае единственно возможная, а более точное представление в настоящее время не поддается расчету. Однако возникает реальная опасность, что измененная потенциальная поверхность белка может иметь мало общего с реальной энергетической поверхностью.

В работе [63] предложен иной подход, который в принципе применим и при точном представлении белковой молекулы. Хорошо известно, что внутренние переменные, определяющие конформацию белка, не являются независимыми в пределах одного остатка. Значение одной переменной (обычно торсионный угол) предопределяет возможные допустимые значения некоторых других переменных. Тем самым нет необходимости в испытании всех возможных комбинаций, так как многие из них в высшей степени маловероятны. Главная трудность состоит в том, чтобы удачно выбрать значения главных переменных и избежать исследования маловероятных конформаций.

Упомянутая процедура может быть формализована следующим образом. Во-первых, представим обычным способом выражение для минимизируемой конформационной энергии в виде функции переменных торсионных углов v_1, v_2, ...

$$E = E(v_1, v_2, \ldots, v_m) \tag{21.12}$$

Затем рассмотрим наборы переменных, сгруппированных по принципу взаимозависимости. Например, переменные от v_{i-m} до v_{i+m} могут составлять один из таких наборов. Для каждого из образованных наборов переменных составляется связующая функция w_j:

$$w_j = f(v_{i-m}, \ldots, v_i, \ldots, v_{i+m}) \tag{21.13}$$

Связующая функция передает ход траектории в некоторой области конформационного пространства, определяемого набором переменных v_{i-m}, ..., v_i, ..., v_{i+m}. Вид функции подобран таким образом, что значение w_j отвечает расстоянию вблизи траектории поиска. Тем самым значение w_j определяет в конформационном пространстве переменных v_{i-m}, ..., v_i, ..., v_{i+m} и положение точки, принадлежащей самой траектории. Выражение для вектора $P(v_{i-m}, \ldots, v_i, \ldots, v_{i+m})$, задающего положение точки, выглядит следующим образом:

$$P(v_{i-m}, \ldots, v_i, \ldots, v_{i+m}) = f^{-1}(w_j) \tag{21.14}$$

где f^{-1} — обращение функции w_j в уравнении (21.13). Выполнение подобных операций для каждого из наборов переменных позволяет использовать все связи между переменными и вычислить энергию с помощью уравнения (21.12). Польза изложенного подхода заключается в том, что энергию минимизируют в виде функции меньшего числа переменных:

$$E = E(w_1, w_2, \ldots, w_N) \tag{21.15}$$

Конформация системы, определенная через переменные w, при необходимости может быть представлена через переменные v с помощью аппроксимирующей процедуры, в которой конформация варьируется в виде функции от переменных w.

Полезным свойством функции f^{-1} является единственность ее значения. Как на практике выбирают функцию f^{-1}? К настоящему моменту известны работы, в которых применялись как очень простые функции, отвечающие простым траекториям, так и более громоздкие функции, ведущие к достаточно сложным траекториям. В работе [62] для f^{-1} выбрано уравнение наклонного эллипса, описывающее конформационное пространство двух торсионных углов Ф и Ψ для каждого остатка в полипептидной цепи белка. Значению w, соответствует угол D между двумя векторами с началом в центре эллипса. Один из векторов фиксирован в пространстве, тогда как второй направлен к рассматриваемой периферийной точке.

С помощью подбора параметров удалось достигнуть значений $D=0$ и 360° для полностью вытянутой складчатой формы полипептидной цепи, $D=+90°$ для классической правовинтовой α-спирали, $D=-90°$ — для левой α-спирали и т. д. Экономия времени, достигнутая в результате применения рассмотренного здесь эвристического метода для процесса самоорганизации панкреатического трипсинового ингибитора, оказалась весьма заметной по сравнению с методом Левитта иВаршела [33]. Важно также отметить, что ускорение вычислений достигнуто при более корректном представлении деталей строения белковой цепи, чем в работе Левитта и Варшела.

Естественно, что все аналогичные методы связаны с применением ограничений и условий, так как искомое решение должно соответствовать определенной траектории в изучаемом конформационном пространстве. При этом следует специально позаботиться о том, чтобы траектория поиска захватывала все наиболее важные конформации (например, α-спираль) и проходила достаточно близко от всех возможных решений. В этом отношении выбор эллиптической траектории представляется достаточно спорным, хотя при этом и есть возможность охватить поиском конформации типа α-спирали, β-слоя и β-изгиба. [62]. Существует, конечно, опасность, что в белке, для которого ведется предсказание третичной структуры, конформация какого-нибудь аминокислотного остатка лежит в стороне от эллиптической траектории поиска и по этой причине может быть вообще не включена в рассмотрение. Тем не менее современное состояние метода допускает небольшие отклонения в конформациях остатков, если при этом сохраняется общий ход белковой цепи. Более того, зачастую бывает, что значительные отклонения в конформации одного остатка компенсируются изменениями положения прилегающих остатков, так что общий профиль белковой молекулы сохраняется. Это было показано введением эллиптических ограничений на конформацию каждого аминокислотного остатка в белках с последующей минимизацией среднеквадратичного отклонения координат локализации атомов (обычно это C_α-атомы) от экспериментальных значений. Для ряда белков получено весьма низкое значение среднеквадратичного отклонения положений атомов, равное 1÷1,1 Å, что представляется весьма убедительным в сравнении с отклонением в 4÷6 Å, получаемым при предсказании структур белков с помощью обычной процедуры минимизации энергии.

Еще лучшего соответствия можно добиться, если выбрать более сложные траектории поиска с помощью подбора функции f^{-1}. Один из примеров подобного рода — траектория, аппроксимируемая серией коротких прямых, причем $(I+1)$-я прямая вблизи траектории поиска определяется координатами конечных точек Q_I и Q_{I+1}. Пусть D — параметр, определяющий траекторию на данном участке. В случае когда $D=6{,}3$, траектория поиска на 0,3 аппроксимируется седьмой прямой, соединяющей точки Q_6 и Q_7. В более общем случае, если $D=I+X$ (I — целая, а X — дробная часть параметра D), то траектория поиска на долю X определяется прямой $(I+1)$ между точка-

ми Q_I и Q_{I+1}. Для конформации в точке $P_D=(v_{i-m}, ..., v_i, ..., v_{i+m})=f^{-1}(w_j)$, где $w_j=D$, справедливо следующее соотношение:

$$P_D=Q_I+X(Q_{I+1}-Q_I) \quad (21.16)$$

P_D и Q_N, Q_{N+1} — векторы, каждый из которых содержит столько элементов, сколько переменных v входит в данный набор; векторы Q могут быть представлены в ЭВМ в виде стека векторов, отвечающих точкам конкретной траектории. Напротив, вектор P_D непрерывно меняется и отвечает пробной конформации $P=(v_{i-m}, ..., v_i, ..., v_{i+m})$, что соответствует расстоянию D вдоль траектории поиска. На практике используют циклическую траекторию, так что Q_I заменяет Q_{I+1}, а такая замена осуществляется с учетом модуля функции при текущем значении I и числа прямых, аппроксимирующих траекторию. В отличие от эллипса, использованного в работе [62], последний подход может быть распространен на случай любого числа взаимосвязанных переменных. При этом возникают трудности, связанные с разрывами производных потенциальной функции по расстоянию D. Их можно преодолеть с помощью минимизации по симплекс-методу. Этот метод весьма полезен в предсказании структуры белков [62], причем наличие разрывов в производных не является непреодолимым препятствием при работе симплекс-метода. В то же время известны и иные способы представления траектории поиска, при которых производные по энергии сохраняют непрерывность, но эти способы достаточно сложны и здесь не рассматриваются.

21.5. Предсказание вторичной структуры. Специальный тип расчетов

Предсказания, рассматриваемые в настоящем отделе, основаны на вычислениях без минимизации энергии. Они, однако, бесспорно относятся к эвристическим методам и удобны как прием для выбора стартовой конформации глобулярного белка перед минимизацией энергии. Выбор стартовой конформации особенно актуален в связи с проблемой множественности минимумов. В то же время предсказание вторичной структуры не может прямо привести к третичной структуре объекта, для чего требуется дополнительная обработка, включающая минимизацию энергии. Два серьезных обстоятельства говорят в пользу этого мнения. Во-первых, алгоритмы предсказания вторичной структуры не учитывают роли взаимодействий, ответственных за поддержание компактной третичной структуры, а рассматривают только взаимодействия, наиболее существенные при формировании вторичной структуры. Поскольку вторичная структура все же до известной степени зависит от неучтенных взаимодействий, точное предсказание выполнить не представляется возможным. Во-вторых, даже правильное предсказание вторичной структуры предполагает, что каждый двугранный угол, определяющий строение основной цепи белка, заключен в некотором интервале значений. Небольшая неточность в величине двугранного угла в случае белка большого размера может означать чрезмерную неопределенность пространственных координат многих атомов и самой третичной структуры

исследуемой молекулы. Тем не менее ряд исследователей выполняют предсказание вторичной структуры без последующей минимизации энергии, и такой подход настолько распространен, что заслуживает специального рассмотрения. Следует заметить, что трудно ожидать слишком многого от применения предсказательных методов в отрыве от остальных сведений об объекте и что необходимо помнить об ограниченных возможностях метода.

Если при предсказании вторичной структуры не используются методы расчета потенциальной энергии, то что же они представляют из себя? За исключением тех из них, в которых привлекаются экспериментальные данные по переходу спираль — клубок в синтетических полипептидах, подавляющее число методов основано на статистических подходах. Они используют частоты встречаемости конформационных состояний для индивидуальных аминокислотных остатков в таблицах зависимостей последовательность — конформация для белков с известной пространственной структурой. Самый простой пример предсказательного подхода состоит в привлечении экспериментального факта о том, что пролин никогда не встречается в спиральных участках белков, входящих в банк пространственных структур (за исключением N-концевой позиции). Поэтому при поиске энергетического минимума случай, когда остаток пролина присутствует в спиральной области исходной конформации белка, вообще не рассматривается.

Усилия исследователей направлены на поиск алгоритмов и параметров, которые в состоянии отразить наблюдаемые зависимости между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой белка и которые могут также предсказывать конформации белков, не входящих в исходный базовый набор белков. В ранних предсказательных методах каждый из 20 аминокислотных остатков относился либо к спиралеобразующему, либо к спиралеразрушающему типу. Тот факт, что ни один из аминокислотных остатков не имеет единственной конформации, был учтен введением ряда простых правил (например, что для возникновения α-спирали необходимо присутствие по крайней мере четырех спиралеобразующих остатков). Более того, изучение перехода спираль — клубок в синтетических полипептидах показало, что представление аминокислотных остатков в виде только спиралеобразующих либо спиралеразрушающих звеньев является слишком грубым. В связи с этим для всех 20 аминокислотных остатков была предложена шкала спиральной предпочтительности [48]. В поисках удовлетворительной предсказательной процедуры, которая бы использовала минимум допущений и основывалась на наиболее объективных свойствах исходной базы данных, были

привлечены также методы теории информации. Целью этой попытки было желание устранить неоправданное влияние физических факторов и обрабатывать сведения о последовательности и конформации белков как два текста, связанных неизвестным кодом. Для повышения объективности заключений представления теории информации дополнили оцениванием по Байесу. Такой подход подразумевает выявление в конечных данных субъективной составляющей и уменьшение или устранение ее влияния. Формальное обоснование такого подхода, а также его различные приложения рассмотрены в работе [58].

Относительная простота реализации методов предсказания вторичной структуры обусловили появление в разных лабораториях многих алгоритмов. Безусловного предпочтения, однако, заслуживают методы, использующие информационные представления. Эти представления направлены не на разработку конкретных предсказательных алгоритмов, а на выработку необходимого общего формализма при поиске оптимальных алгоритмов. Например, было показано [64], что распространенный метод Чоу и Фасмана [6, 7] вполне соответствует теории информации [63], если пренебречь вкладом, вносимым межостаточным взаимодействием. Более того, на примере указанного метода можно продемонстрировать особенности информационных подходов в данной области. Используется следующее основное соотношение:

$$I(S;R) = \#[f(X,R)] - \#[f(\bar{X},R)] - \#[e(X,R)] + \#[e(\bar{X},R)] \tag{21.17}$$

Смысл функции # [ ] объяснен ниже в соотношении (21.18). Выражение (21.17) определяет количество информации в остатке типа R (например, аланине), находящимся в конформационном состоянии S (например, α-спираль). При этом $f(X, R)$ — наблюдаемая частота встречаемости (число событий) остатка R в состоянии $S=X$ в базе данных, а $f(\bar{X}R)$ — частота, с которой остаток R принимает остальные конформации $S=\bar{X}$. Частоты $e(X, R)$ и $e(\bar{X}, R)$ соответствуют «ожидаемым частотам», определяемым по критерию «χ-квадрат», например $e(X,P)=f(X)\cdot f(P)/f_{\text{общ}}$. Функция # [ ] выражает «содержание информации» в этих частотах:

$$\#[0]=0$$
$$\#[i]=\sum_i \frac{1}{i} \tag{21.18}$$

Значение функции для нецелых аргументов могут быть получены с помощью интерполяции.

В работе [58] в качестве значений i при $i>1$ использованы наблюдаемые частоты, уменьшенные на единицу, но такая возможность, хотя она используется весьма широко, связана со спорной теоретической предпосылкой. В соответствии с вышеприведенной формулой неизменное значение частоты может непосредственно служить аргументом функции. Это не приводит к существенному изменению результата. Суммирование или вычитание небольших чисел отражает доверие к результату в зависимости от способа сбора данных, но эффект такого учета должен быть небольшим.

Любое конкретное применение метода информации зависит от того, каким из вкладов пренебрегают в выражении $I(S_j; R_1, ..., R_n)$. Здесь j — индекс остатка, состояние которого предсказывают, а $R_1, ..., R_n$ — полная последовательность белка, для которой ведется предсказание вторичной струк-

туры путем рассмотрения всех индексов j. В простейшем варианте метода, позволяющем получать результаты не хуже, чем в случае других алгоритмов [12], используется приближение следующего типа:

$$I(S_j;\ R_1,\ \ldots,\ R_n) = \sum_{m=-8}^{m=+8} I(S_j;\ R_{j+m}) \qquad (21.19)$$

Здесь j — индекс остатка, для которого ведется предсказание конформации, S_j — тип конформации, а R_{i+m} — тип остатка, отстоящего на m позиций вдоль аминокислотной последовательности белка. Положительные m соответствуют аминокислотным остаткам в направлении С-конца, а отрицательные — в направлении N-конца полипептидной цепи, считая от остатка с индексом j.

Влияние остатков за пределами $m \pm 8$ на вторичную структуру белка принято несущественным, хотя эти границы в известной степени условны. Значение $m=0$ отвечает вкладу остатка, занимающего центральное положение в сегменте. Аналогичное предсказание выполняют для каждого остатка в последовательности от $j=1$ до $j=n$, после чего при необходимости расчеты повторяют для любого конформационного состояния S. В результате каждому из остатков приписывают то из конформационных состояний S, для которого уровень информации имеет наивысшее значение. На практике из результатов, полученных для каждого из состояний, вычитают некоторую условную константу, зависящую от типа конформации S. Эту константу можно рассматривать как дополнительную информацию, полученную из данных по круговому дихроизму. Необязательно знать точное содержание вторичной структуры, а достаточно отнести белок к одному из типов, например спиральному, β-складчатому и т. д. Физический смысл такого приема очевиден, поскольку белок, содержащий много β-участков, будет иметь тенденцию к дальнейшей стабилизации путем кооперативного образования водородных связей в складчатой структуре. Не менее важно также, что длинные α-спирали более стабильны, чем короткие.

Работу [12] можно рассматривать как типичную для подобных исследований; были приняты во внимание четыре конформационных состояния: правая α-спираль, вытянутая цепь (потенциальный элемент складчатой структуры), β-изгибы и нерегулярная структура. При отнесении к четырем конформационным типам ~60% остатков были правильно предсказаны как принадлежащие (или не принадлежащие) данному типу. Такое качество предсказания наблюдалось для многих белков, но для нескольких объектов имелись серьезные отклонения.

Примененный алгоритм реализован в виде программы на языке высокого уровня, но короткие последовательности можно было легко просчитать вручную. Было показано, что полученные таким образом результаты предсказания возможно использовать для формирования стартовой конформации белков при моделировании процессов самоорганизации с помощью энергетической минимизации.

21.6. Исходные предпосылки расчетов

До настоящего момента обсуждалась сущность методов, но ничего не говорилось о практическом применении этих методов. Следует заметить, что любое из применений (например, поиск конформации с минимальной энергией, учет влияния растворителя, расчет колебательной энтропии) может быть успешным, если был удачно выполнен расчет потенциальной поверхности.

Естественно, что для получения хорошей потенциальной поверхности важно иметь удачные потенциальные функции. Можно, конечно, каждую точку конформационного пространства просчитать с помощью квантовохимических методов. Однако для качественных расчетов ab initio потребуется примерно около часа машинного времени на одну только конформацию для системы из 20 атомов. Кроме того, чтобы добиться достоверного значения свободной энергии, метод вычисления потенциальной поверхности, например метод Монте-Карло, может требовать расчета 6—7 миллионов конформаций для системы из нескольких тысяч атомов. Ясно поэтому, что квантовомеханический метод расчета непригоден для подобной цели. Основные надежды здесь, естественно, связаны с получением хороших потенциальных функций.

Вопрос о том, насколько удачны применяемые потенциальные функции, представляет собой в известной степени дилемму. С одной стороны полагают, что набор потенциальных функций тем лучше, чем больше с его помощью можно предсказать экспериментальных величин с допустимой точностью. Однако, с другой стороны, использование потенциальных функций предполагает применение методов, связанных с наличием ряда серьезных приближений. В случае если совпадение с экспериментом плохое, трудно понять, ответственны ли за это потенциальные функции или применяемый метод.

Названная дилемма изучалась в лабораториях Хаглера и Робсона, и для ее решения были предложены некоторые приемы. Рассмотрим в общих чертах основные выводы, полученные при этом [15, 17, 21, 24, 62, 66]. Конечно, другие исследователи сделали также существенный вклад в данной области (см. данные табл. 21.2 и обзор [44]). Можно, однако, сказать, что вопрос об улучшении качества потенциальных функций и их адекватности применяемым методам не обсуждался в работах, упомянутых в табл. 21.2.

Хотя одновременное изучение потенциальных функций и методов их применения представляется весьма важным, необходимо помнить, что раздельное изучение каждого из аспектов весьма затруднительно. Тем не менее Хаглер и Лифсон [15] и Хаглер с сотр. [17] сделали важный первый шаг при параметризации потенциальных функций, исходя из свойств кристаллов пептидоподобных молекул (например, структурных данных и теплот сублимации). Путем автоматического варьирования параметров и оптимизации методом наименьших квадратов данных расчета и эксперимента удалось добиться удовлетворительного качества функций и предсказания физических свойств молекул. Поскольку колебательные движения частиц рассматриваемой системы незначительны, положение каждого

Таблица 21.2. Некоторые результаты практических расчетов структур пептидов и белков (без данных о моделировании укладки белков)

Изучаемая система	Литература
Исследование пептидной группы и ее *цис-транс*-переходы	18, 57, 77
Исследование конформационных возможностей аминокислотных остатков в полипептидах	24, 34, 35, 45, 66, 67, 78
Исследование β-изгибов	25, 26, 37, 45
Меланотропин H-Pro-L-Leu-Gly-NH_2	56
Тиреотропин Pyroglu-His-Pro-NH_2	6
Энкефалины Tyr-Gly-Gly-Phe-Met и Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	1, 13, 27, 43, 69
Декапептид лютеинизирующего гормона люлиберина	41, 42
Циклические пептиды	10, 69
Коллаген	39, 46
Уточнение структуры глобулярных белков	32, 72, 74
Внутренняя динамика белков	36
Предсказание структуры по данным для гомологичных белков	65, 72, 75
Укладка полипептидной цепи, исходя из вторичной структуры белка	8, 55, 71

атома в молекуле можно определить вполне точно. Это не совсем верно для молекул в растворе, когда отсутствуют экспериментальные сведения о положении и ориентации молекул воды. Тем не менее и в этом случае использование потенциальных функций для предсказания свойств системы приводит к реалистическим результатам, что служит свидетельством обоснованности принятых приближений. Разумеется, потенциальные функции необходимо постоянно выверять на все новых примерах, поскольку их вывод основан на рассмотрении межмолекулярных взаимодействий в кристаллах, тогда как применение, как правило, касается внутримолекулярных взаимодействий в окружении, близком к природе биосистем.

Метод расчета физических свойств с применением потенциальных функций следует признать вполне удовлетворительным даже и в наиболее распространенном простом приближении. В этом приближении (разд. 21.2) используют жесткую геометрию и не принимают во внимание величину кинетической энергии. Влиянием растворителя также пренебрегают (учитывают только диэлектрическую проницаемость). Расчет физических свойств выполняют в соответствии с принципами статистической механики. Однако, если подбор диэлектрической проницаемости или типа потенциальных функций, базирующихся на структурных данных, не может обеспечить резуль-

татов, отвечающих конформационным возможностям системы, простейший подход в таком случае считают неприменимым. В подобной ситуации при необходимости переходят на другой уровень физического приближения.

21.6.1. Проверка потенциальных функций, полученных на основе кристаллографических данных, с помощью простых приближенных методов

В работе [62] с помощью потенциальных функций, полученных Хаглером, был удовлетворительно предсказан ряд физических свойств, зависящих от конформации молекул. Среди таких свойств можно отметить константы спин-спинового взаимодействия фрагмента NH-CH, рассчитанные по спектрам ЯМР N′-метиламидов N-ацетиламинокислот, а также дипольные моменты ряда олигопептидов. В особенности интересно применение данных ЯМР, так как спектры ЯМР полностью зависят от конформации объекта и теория и методы расчета для такого случая развиты достаточно хорошо. Действительно, согласие теоретических и экспериментальных данных для многих N-метил- и N,N′-диметиламидов выглядит достаточно убедительно. Например, расчетное значение константы спин-спинового взаимодействия для классической модельной молекулы N′-метиламида N-ацетилаланина составляет 7,8 Гц, что попадает в середину экспериментального интервала 7,8±0,5 Гц.

Тем не менее численные эксперименты на ЭВМ недавно показали, что расчеты спин-спиновых констант нельзя считать наиболее удачными примерами для подтверждения применяемой теории. В самом деле, потенциальные функции в известной степени зависимы от предсказываемых свойств, и неудивительно, что многие из этих функций приводят к удовлетворительному согласию с экспериментальными константами. Следовательно, даже в случае хорошего соответствия этот факт не следует переоценивать. В то же время оказалось возможным отказаться от некоторых ранних наборов потенциальных функций, предложенных Хаглером с сотр. [17]. Известно, что функции типов 9-6-1 и 12-6-1, для которых проводилась независимая параметризация, находились в хорошем согласии с кристаллографическими данными. Тем самым структурные данные не позволяли отдать предпочтение какому-либо из наборов, хотя между ними и существует заметное различие во вкладе составляющей отталкивания. Однако расчет величин вицинальных констант ЯМР и некоторых других свойств однозначно свидетельствует в пользу более плавных («мягких») функций типа 9-6-1. Этот выбор был позднее подтвержден при изучении кристаллов карбоновых кислот [19] и при кван-

товомеханической оценке вклада составляющей стерического перекрывания [24]. Следует иметь в виду, что этот вклад в действительности зависит от типа атома, но в целом функции типа 9-6-1 более приложимы к биологическим молекулам, чем популярные функции типа 12-6-1.

В известной степени представляют практический интерес и случаи, в которых наблюдается расхождение теории и эксперимента. При этом, конечно, следует быть уверенным, что действительно имеет место неприменимость данного расчетного метода. Многие так называемые «экспериментальные свойства» оказываются на деле суммой параметров, выведенных из неточных данных с помощью каких-либо теоретических приемов. Если учесть неопределенность, вносимую подобным образом, то вообще окажется трудным найти случай, когда расчет и эксперимент дают противоречивую картину. Наиболее четко несоответствие наблюдаемых и расчетных величин проявляется при изучении характеристичеоских свойств клубкообразных полипептидов. К таким свойствам относятся характеристическое расстояние между концами полимерной цепи, определяющее радиус инерции, а также гидродинамические и светорассеивающие характеристики (в случае длинных полимеров их обычно преобразуют к виду, не зависящему от размера цепи). Расчетное значение характеристического расстояния для полимера без разветвления при C_β-атоме составляет 19, тогда как эксперимент даже по самым осторожным оценкам дает интервал от 5 до 12 [3, 4, 23, 40].

Трудности, однако, не ограничиваются интерпретацией экспериментальных данных о физических свойствах клубкообразных биополимеров [23]. Действительно, точность расчета характеристических свойств с помощью потенциальных функций зависит от целого ряда приближений. В связи с этим нами с привлечением точных методов расчета, включая метод Монте-Карло, был изучен эффект ионного экранирования на примере полиглутаминовой кислоты. Эти исследования привели к ряду интересных результатов, но с их помощью не удалось устранить отмеченные противоречия, что свидетельствует об ограниченных возможностях потенциальных функций при описании внутримолекулярных взаимодействий.

Были выполнены также численные эксперименты по выявлению тех свойств потенциальных поверхностей и потенциальных функций, которые могут все виды физических величин привести в соответствии с их экспериментальными значениями. В предварительном исследовании Хаглера и Робсона [66] было найдено, что понижение высоты барьеров на потенциальной поверхности облегчает достижение указанной цели. Уменьшение размеров некоторых атомов оказывает тот же эффект, что

и уменьшение высоты потенциальных барьеров. Однако уменьшение размеров или «жесткости» атомов оказывается применимым не всегда. Например, в лаборатории Хаглера было показано, что подобный методический прием противоречит структурным данным, исходя из которых были параметризованы потенциальные функции (пересчет кристаллографических размеров выполнялся с применением не только измененных параметров, но и новых «мягких» экспоненциальных функций). Кроме того, было показано [24, 66], что профиль потенциальной поверхности, полученный с помощью потенциальных функций типа 9-6-1, находится в отличном согласии с данными расчета квантовомеханическим методом ab initio с расширенным базисом. В минимумах потенциальной поверхности абсолютные значения функций отличались в этих расчетах на не более 25 ккал/моль, и не было обнаружено никаких оснований для «сжатия» или «смягчения» атомов.

Таким образом, возникла новая дилемма: каким образом, используя одни и те же потенциальные функции, добиться, чтобы все расчетные физические величины попадали в допустимый интервал экспериментальных значений?

21.6.2. Проверка потенциальных функций, полученных из структурных данных, с помощью более точных методов

Проще всего при ответе на сформулированный выше вопрос считать, что расчет физических свойств с использованием данных потенциальных функций неправомочен. Однако правильнее все же проанализировать, не связано ли завышение барьеров с каким-нибудь неоправданным упрощением даже при правильных потенциальных функциях? И действительно, такое упрощение имеет место: это использование жесткой геометрии. Хорошо известно, что длины связей и валентные углы в молекулах не постоянны, причем изменения валентных углов могут быть очень важны для предотвращения столкновения атомов. Например, в четырехатомной системе с конфигурацией связей A-B-C-D для ослабления взаимодействия A...D важно несколько увеличить углы A-B-C и B-C-D.

Подходящим методом, допускающим ослабление взаимодействия частиц рассмотренным образом, является приближение валентного силового поля, т. е. такой набор потенциальных функций, при использовании которого энергия зависит и от длин связей и от валентных углов при соответствующем типе химических связей. Одно из первых валентных силовых полей рассчитано Хаглером и Штерном (неопубликованная работа) с привлечением данных по колебательным частотам и гео-

метрии N-метилацетамида. Решение обратной задачи показало, что валентные углы обладают достаточной подвижностью для требуемого понижения энергетических барьеров. Введение валентного силового поля позволило сообщить значительную подвижность пептидным молекулам [67]. Например, характеристические расстояния в полипептидах могут быть понижены с 19 до 5, что соответствует нижнему значению экспериментального интервала. Тем самым было показано, что концепция гибкой геометрии играет весьма важную роль при уточнении расчетов и должна обязательно приниматься во внимание. При дальнейшем изучении и улучшении свойств валентного силового поля квантовомеханическим методом с расширенным базисом были определены оптимальные значения всех необходимых параметров [24]. Полученное при этом валентное силовое поле соответствовало несколько меньшей подвижности пептидной группы по сравнению с эмпирическим силовым полем. Поэтому валентные углы могли меняться только в пределах $\pm 5°$, что тем не менее было достаточно для сохранения основных преимуществ нового приближения.

При введении концепции гибкой геометрии не требуется особых усилий для расчета свободной энергии как функции расширенного набора внутренних степеней свободы. Для оценки дополнительного вклада, обусловленного гибкой геометрией. выполнены расчеты молекул гексапептидов [20], содержащих остатки аланина, метионина и глицина (для этих соединений имеются экспериментальные данные). Оказалось, что энтропийный вклад в свободную энергию сопоставим по величине с потенциальной энергией и этим вкладом нельзя пренебрегать при точных вычислениях.

Если колебательные степени свободы биологических молекул обеспечивают такой значительный вклад в конформационную свободную энергию, то не менее важную роль играет также оценка влияния, вносимого растворителем. В самом деле, хорошо известно, что стабильность глобулярных белков во многом обусловливается гидрофобными взаимодействиями, энтропийный вклад которых зависит от природы растворителя. Кроме того, большую роль играет также вклад, вносимый энергией сольватации, образованием водородных связей с участием молекул растворителя и влиянием полярных групп растворителя на электростатические взаимодействия внутри молекулы белка.

С помощью метода Монте-Карло было рассчитано положение молекул воды в гидратированных кристаллах лизоцима и ряда циклических пептидов [16]. Конформация молекул белка и пептидов в этих расчетах принималась такой же, как и в кристаллах. Было показано, что наблюдается удовлетворитель-

ное согласие в расположении молекул воды, полученном расчетным и экспериментальным путем. Поэтому заслуживают доверия полученные тем же методом результаты по изучению растворов других пептидов [22], для которых не было соответствующих экспериментальных данных. Во всяком случае, наиболее существенные выводы последней работы не должны зависеть от вида потенциальных функций или характера приближения, используемого в методе Монте-Карло. Например, оказалось, что влияние растворителя на конформационную энергию малых пептидов коррелирует с потенциальной энергией изолированной молекулы. Таким образом, исследования, выполненные на более высоком уровне приближения, дали несколько неожиданный результат, согласно которому более ранние «количественные» расчеты не представляют теперь большой ценности. Очевидно также, что вклад потенциальной энергии, рассчитанной обычным образом, сравним по величине с другими вкладами в свободную энергию системы. Конечно, важное значение имеют и конкретные характеристики изучаемой системы. Например, в случае неполярного растворителя пренебрежение его влиянием не ведет к искажению результатов. Следует заметить также, что всегда возможны и более точные расчеты, требующие в настоящее время непомерно много машинного времени, но быстрое развитие вычислительной техники все больше будет способствовать выполнению подобных исследований. И наконец, совершенствование теоретических представлений должно содействовать выработке более подходящих расчетных приближений. Так, предположение о решающей роли «реакционного поля» при взаимодействии растворителя и растворенного вещества представляется весьма перспективным, тем более что при этом возможно аналитическое представление соответствующих зависимостей. Кроме того, такие взаимодействия можно ограничить масштабами первой сольватной оболочки, как это было показано при моделировании процесса самоорганизации белков [33, 62].

21.6.3. Попытки предсказания третичной структуры глобулярных белков

Идея предсказания третичной структуры глобулярных белков, исходя из аминокислотной последовательности, давно привлекала внимание исследователей. Ранние попытки в этой области носили в основном случайный характер, и только в последнее время появились работы, в которых разрабатываются подходы к решению упомянутой проблемы. Некоторые ученые, однако, продолжают придерживаться мнения, что подготовительный этап здесь еще не завершен и для выполнения серь-

езных, глубоких исследований время еще не наступило.

В настоящий момент уже ясно, что главные трудности связаны не с размером белковой молекулы, а с наличием на энергетической потенциальной поверхности такой молекулы минимумов. Поэтому первые работы были направлены на сглаживание потенциальных поверхностей, чтобы отчетливо выделялась траектория, ведущая к глобальному минимуму. При таком сглаживании, естественно, необходимо пожертвовать рядом деталей структурного представления белка. Основополагающей в методическом отношении здесь является работа Левитта иВаршела [33], но в качестве пионерской следует признать работу Птицина и Рашина [54] по предсказанию структуры миоглобина, исходя из существования отдельных α-спиралей. Моделирование самосборки белка осуществляли без применения ЭВМ, и поэтому спирали представляли в виде цилиндров. На поверхности этих цилиндров выделяли гидрофобные участки, которым разрешалось взаимодействовать друг с другом с образованием оптимальных структур. В результате оказалось, что одна из возможных упаковок спиралей соответствует наблюдаемой нативной структуре.

Более общий подход Левитта и Варшела допускает упрощенное представление не только спиральной, но и других конформаций. Предложенный алгоритм был запрограммирован для ЭВМ, что, однако, не делает метод свободным от ряда серьезных недостатков. Так, в основной цепи белка отсутствовала пептидная группа атомов CO-NH, C_α-углеродные атомы соединялись виртуальной связью, а боковые цепи заменялись «укрупненными атомами» (большими искусственными атомами, заменяющими целые атомные группировки). Эта модель была впервые применена к небольшому белку — панкреатическому трипсиновому ингибитору [33]. В работе [33] был достигнут определенный успех, который с позиций сегодняшнего дня имеет в основном историческое значение. Следует отметить, что это исследование получило высокую оценку и вызвало оживленную дискуссию [14, 44]. Благодаря широкому обсуждению были выработаны общие подходы, применяемые при предсказании структуры белка, согласно которым любая соответствующая процедура должна: 1) быть полностью автоматической; 2) иметь входные параметры, применимые к любым белкам; 3) быть количественно воспроизводимой и 4) быть свободной от неоправданных приспособлений к конкретным объектам. Кроме того, единственной переменной входной информацией о белке должна служить его аминокислотная последовательность. Впоследствии именно Левитт внес большой вклад в развитие методов предсказания третичной структуры белков.

Изложенный выше метод резко отличается от предложенного ранее [30], согласно которому укладка белковой цепи в пространстве выполняется с помощью компьютерного видеотерминала. В частности, интерактивная графика применяется как мощный инструмент белковой инженерии в лаборатории Бландела, который, однако, считает, что подобные технические новшества следует использовать достаточно осторожно. Действительно, многие решения, принимаемые человеком, несколько медленнее может выполнить и неинтерактивная программа, что делает получаемый результат достаточно объективным и воспроизводимым. Поэтому при экономии машинного времени за счет интеллектуальных возможностей важно быть уверенным, что есть и объективный (автоматический) путь решения.

Каким образом можно судить о качестве предсказания третичной структуры белка? В случае вторичной структуры белка для наглядной оценки результата (хотя и не всегда безупречной) служит число аминокислотных остатков с правильно предсказанным типом конформации. В случае третичной структуры сравнивают положения остатков в расчетной и экспериментальной структурах. Например, Левитт и Варшел использовали среднеквадратичное отклонение межостаточных расстояний в расчетной структуре и межостаточных расстояний в экспериментальной структуре. В кристаллографии белков эта величина не тождественна среднеквадратичному отклонению между расчетными и наблюдаемыми положениями атомов при сравнении похожих структур. Такое сравнение предполагает суперпозицию структур с использованием операций переноса и вращения какой-либо из структур по отношению к другой с целью минимизации среднеквадратичного отклонения. Главная трудность при сравнении состоит в том, что позиция ни одного из аминокислотных остатков не может считаться безусловно правильной или ошибочной. Кроме того, при усреднении отклонения («оценки») по всей молекуле белка маскируется разница между хорошо и неудачно предсказанными участками молекулы. В связи с этим среднеквадратичную оценку полезно дополнять таблицей остаток-остаточных расстояний [47, 49] и стереоизображениями молекул.

Одна из модельных укладок молекулы панкреатического ингибитора, полученная Левиттом и Варшелом, имела среднеквадратичную оценку в 6 Å, что по сравнению с нативной структурой считалось обнадеживающим результатом. Оказалось, однако, что величина среднеквадратичной оценки в 6 Å необязательно соответствует структуре, близкой к нативной [14]. Для того чтобы теоретическая укладка с оценкой в 6 Å была близка к нативной, необходимо соблюдение ряда допол-

нительных критериев, чего не было выполнено в работе по сворачиванию панкреатического ингибитора. В последние годы в ряде работ высказано мнение, что среднеквадратичное отклонение само по себе мало о чем говорит, а величине в 6 Å может соответствовать любая компактная случайная структура. Если же при моделировании процесса самоорганизации белка среднеквадратичная оценка с каждой итерацией все больше стремится к нулю, то можно сделать вывод, что укладка белка осуществляется успешно. Согласно данным, полученным в лаборатории автора при сравнении структур гомологичных белков, оценка сходства, равная <3 Å, является признаком значимого сходства. В то же время оценка в 4 Å может уже соответствовать существенно различным структурам. Учитывая этот факт, а также то обстоятельство, что нет какой-либо другой объективной оценки результата, трудно рассчитывать на правильный вывод о схожести структур, если не преодолено пороговое значение 3 Å. Когда Левитт и Варшел применили свой ранее предложенный подход к парвальбумину, результат оказался плохим, и поэтому осталось неясным, приложим ли этот метод к другим белкам, кроме панкреатического трипсинового ингибитора.

В альтернативном подходе [28] за небольшое число итераций была достигнута среднеквадратичная оценка в 4,7—6,5 Å для трипсинового ингибитора и 4,0—6,0 Å для рубредоксина. Вместо энергетических расчетов применялся метод оптимизации, с большим числом ограничений, связанных с экспериментальными сведениями о белковой структуре. При отклонении какой-либо расчетной физической величины от ожидаемого значения накладывался штраф, размер которого увеличивался с ростом отклонения. Не вполне ясной остается система штрафов для участков структуры, для которых отсутствуют экспериментальные данные. Кроме того, полученный результат является достаточно грубым, так как все аминокислотные остатки аппроксимировались «гигантскими атомами». Однако качество предсказания этим методом — самое лучшее на начало 1980 г., и, по-видимому, применяемый алгоритм может быть полезен для построения стартовой конформации белка перед ее тщательной энергетической минимизацией.

Кроме разобранных методов предсказания можно назвать алгоритм Шераги [44, 73], который использует метод Монте-Карло в модификации Метрополиса (разд. 21.4.3). В качестве первого шага при укладке полипептидной цепи белка в подходе Шераги осуществляется предсказание вторичной структуры. О качестве получаемых результатов судить затруднительно, но, по-видимому, оно не хуже, чем при моделировании процесса самоорганизации белков по Левитту — Варшелу.

21.7. Современное состояние предсказательных методов

В последние пять лет были получены многие важные результаты, в связи с чем неуклонно возрастала вера в то, что проблема укладки белковой молекулы будет решена уже в ближайшем будущем. В настоящем обзоре оказалось невозможным обсудить в полном объеме перспективы указанной проблемы; выскажем лишь некоторые соображения на этот счет. Необходимо заметить, что не все исследователи придерживаются одной точки зрения относительно главного направления предстоящих исследований. Например, Левитт и Шерага считают, что для успешного моделирования пространственной укладки белка весьма полезно использовать экспериментальные сведения о конформационных возможностях объекта. Очень информативны в этом отношении данные ЯМР, из которых легко можно получить многие межатомные расстояния в молекулах белков. В этом случае проблема заключается в том, чтобы обойтись минимумом экспериментальных сведений для достижения результата. Ясно также, что с развитием теории таких сведений будет требоваться все меньше и меньше. Во-вторых, в лаборатории автора было показано, что метод предсказания третичной структуры полностью применим к «мини-белкам», т. е. биологическим пептидам, содержащим до десяти аминокислотных остатков. Качество предсказания для белков длиной 100—200 остатков должно находиться в соответствии с назначением результата. Например, было показано, что достаточно приближенные расчеты вполне применимы для целей конструирования искусственных пептидных вакцин, которые после присоединения к молекуле-носителю приобретают иммуногенные свойства и начинают производить антитела против изучаемого пептида. Можно надеяться также, что предварительное моделирование пространственной структуры задолго до получения исчерпывающих кристаллографических данных об объектах окажется полезным в биотехнологических исследованиях. Поэтому появление все большего числа работ, посвященных белкам с неизвестной третичной структурой, представляет гораздо больший интерес по сравнению с академическими, методическими работами, касающимися белков с уже имеющимися подробными данными о конформации. Фармакологов, нейрохимиков, иммунологов и генных инженеров как раз весьма мало интересуют расчеты белков с хорошо известной из эксперимента пространственной структурой; для этих групп ученых крайне важны предсказательные расчеты белков, которые ими изучаются.

К важным факторам, определяющим качественные и количественные возможности расчета молекул белка, относятся

скоростные характеристики алгоритмов и программ. Хотя увеличение скорости расчетов представляет собой в основном технический вопрос, во многих биологических лабораториях прилагаются значительные усилия в этом направлении. В лаборатории автора, например, скорости расчетов возросли по крайней мере в тысячу раз по сравнению с 1979 г. Наверное, одним из самых мощных факторов ускорения можно считать доступ к высокоскоростным векторным машинам типа CRAY 1 или CYBER 205. Например, использование ЭВМ CYBER 205 позволило увеличить скорость расчета в 30 раз по сравнению с предшествующей моделью CDC 7600. Алгоритмы, реализуемые на подобных ЭВМ, наряду с простой «векторизацией» программ должны использовать дополнительные возможности, представляемые векторными процессорами. Значительное увеличение скорости расчетов позволило значительно увеличить число допустимых вариантов укладки белка, что в свою очередь послужило основанием для ряда важных выводов. Оказалось возможным изучить детали потенциальной поверхности как функции конформации белка. Результаты, полученные нами и другими исследователями, показали, что расчетная поверхность содержит несколько обширных оврагов, в каждом из которых имеются десятки, сотни, а иногда и несколько тысяч локальных минимумов. Выяснилось также, что анализ формы потенциальной поверхности, выполненный Левиттом, на деле представляет собой описание формы единственного оврага, содержащего нативную конформацию. Кроме того, подходы Левитта, Шераги и Робсона оказались очень сходными в достижении нативной конформации при условии, что нужный овраг уже известен. Напротив, подход Бландела и др. заключается в изучении и классификации всех известных конформационных мотивов и их сопоставлении с аминокислотными последовательностями белков. В случае предсказания неизвестной конформации белка необходимо правильно выбрать структурный мотив, соответствующий конкретной первичной структуре белка, после чего переходят к минимизации энергии в предположении, что стартовая конформация расположена вблизи оврага, содержащего нативную структуру белка.

Поиску критериев, соблюдение которых соответствует конформации белка вблизи оврага, посвящены работы Робсона. Было показано, что величину потенциальной или свободной энергии нельзя считать определяющим фактором и, например, стартовая конформационная точка даже в самом овраге может иметь весьма высокую энергию. Более того, в ряде работ показано, что на дне разных оврагов могут находиться точки с энергией, сравнимой с энергией нативного состояния. Фактором, определяющим нативную конформацию, можно, по-ви-

димому, считать выгодное расположение неполярных гидрофобных групп белка, что носило бы более отчетливый характер при правильном учете в энергетических расчетах роли растворителя. Основываясь на модели растворителя Штернберга для учета внутримолекулярной водородной связи, мы разработали метод, гарантирующий большую стабильность нативной конформации по сравнению с более открытыми конформерами. Тем самым конформации, находящиеся вне нужного оврага, обладают большей свободной энергией, чем конформации внутри оврага, содержащего нативную структуру. Метод пока еще не усовершенствован настолько, чтобы направлять поиск в район, содержащий нативную конформацию. Он успешно работает главным образом в пределах окрестностей нужного оврага. По-видимому, следует таким образом направлять траекторию поиска, чтобы она не вела в глубь неперспективного оврага. В основном путь решения этой проблемы ясен, хотя и предстоит еще преодолеть некоторые серьезные теоретические трудности. Их удастся решить, если осуществить моделирование процесса самоорганизации белков не в трех-, а в четырехмерном пространстве. Расчетное время, необходимое для такого моделирования, удастся заметно сократить, если привлечь последние достижения в топологии пространств.

Следует заметить, что в настоящее время развитие методов предсказания конформации белков сдерживается не столько несовершенством потенциальных функций, трудностями правильного учета влияния растворителя или недостатками программного и технического обеспечения, сколько нехваткой новых фундаментальных математических разработок в данной области. В настоящем обзоре мы ограничились рассмотрением программных средств, позволяющих экономить расчетное время при исследовании конформационного пространства. Тем не менее для осуществления успешной пространственной укладки белковой цепи расходы компьютерного времени весьма внушительны, что связано с упомянутым медленным прогрессом соответствующей области математики. Надо отметить также, что огромные затраты расчетного времени означают также внушительный расход календарного времени и на сегодняшний день можно говорить только о частичных успехах в моделировании процессов укладки белка. Так, весьма обнадеживают успехи в конструировании структурных доменов в белках, но пока не удается вызвать процесс их ассоциации, как это имеет место в нативной структуре (иногда трудно добиться формирования и некоторых из доменов).

В заключение необходимо подчеркнуть, что впереди очень много работы, но быстрый прогресс в данной области дает

основания для оптимизма. На сегодня нельзя еще, к сожалению, привести яркий пример укладки белка средней величины, исходя только из его аминокислотной последовательности. Можно, однако, сказать, что вычислительные методы успешно применяются в отраслях биотехнологии, связанных с конструированием лекарств, уточнением кристаллографических структур, моделированием структуры белков на основании данных о гомологичных белках и т. д. Более того, такое использование теоретических приемов носит все более обычный и обязательный характер.

Литература

1. *Beddel C. R., Clark R. B., Lowe L. A., Wilkinson S., Chang K. J., Cuatrecasas P., Muller R.*, Br. J. Pharmacol, **61**, 351—356 (1977).
2. *Beeman D.*, J. Computational Phys., **20**, 130—139 (1976).
3. *Brant D. A., Flory P. J.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2788—2791 (1965).
4. *Brant D. A., Flory P. J.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2791—2800 (1965).
5. *Burgess A. W., Momany F. A., Scheraga H. A.* Biopolymers, **14**, 2645—2647 (1975).
6. *Chou P. Y., Fasman G. D.*, Biochemistry, **13**, 211—222 (1974).
7. *Chou P. Y., Fasman G. D.*, Biochemistry, **13**, 222—245 (1974).
8. *Cohen F. E., Richmond T. J., Richards F. M.*, J. Mol. Biol., **132**, 275—288 (1979).
9. *Dawidon W. C.*, Comput. J., **10**, 406—410 (1968).
10. *Dygert M., Go N., Scheraga H. A.*, Macromolecules, **8**, 750—761 (1975).
11. *Fletcher R., Powell M. J. D.*, Comput. J., **6**, 163—168 (1963).
12. *Garnier J., Osguthorpe D. J., Robson B.*, J. Mol. Biol., **120**, 97—120 (1978).
13. *Gorin F. A., Balasubramanian T. M., Barry D. C., Marshall G. R.*, J. Supramol. Struct., **9**, 27—39 (1978).
14. *Hagler A. T., Honig B.*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **75**, 554—558 (1978).
15. *Hagler A. T., Lifson S.*, J. Am. Chem. Soc., **96**, 5327—5335 (1974).
16. *Hagler A. T., Moult J.*, Nature (London), **272**, 222—224 (1978).
17. *Hagler A. T., Huler E., Lifson S.*, J. Am. Chem. Soc., **96**, 5319—5327 (1974).
18. *Hagler A. T., Leiserowitz L., Tuval M.*, J. Am. Chem. Soc., **98**, 4600—4612 (1976).
19. *Hagler A. T., Lifson S., Dauber P.*, J. Am. Chem. Soc., **101**, 5122—5130 (1979).
20. *Hagler A. T., Stern P. S., Sharon R., Becker J. M., Naider F.*, J. Am. Chem. Soc., **101**, 6842—6852 (1979).
21. *Hagler A. T., Moult J., Osguthorpe D.*, Biopolymers, **19**, 395—418 (1980).
22. *Hagler A. T., Osguthorpe D. J., Robson B.*, Science, **208**, 599—601 (1980).
23. *Hawkins R. B., Holtzer A.*, Macromolecules, **5**, 294—301 (1972).
24. *Hillier I. H., Robson B.*, J. Theor. Biol., **76**, 83—98 (1979).
25. *Howard J. C., Ali A., Scheraga H. A., Momany F. A.*, Macromolecules, **8**, 607—622 (1975).
26. *Hurwitz F. I., Hopfinger A. J.*, Int. J. Peptide Protein Res., **8**, 543—550 (1976).
27. *Isogai Y., Nemethy G., Scheraga H. A.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 414—418 (1977).
28. *Kuntz I. D., Crippen G. M., Kollman P. A., Kimelman D.*, J. Mol. Biol., **106**, 983—994 (1976).

29. *Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М.* Статистическая физика. — М.: Наука, 1964.
30. *Levinthal C.*, J. Chimie Phys., **65**, 44—45 (1968).
31. *Levitt M.*, J. Mol. Biol., **104**, 59—107 (1976).
32. *Levitt M., Lifson S.*, J. Mol. Biol., **46**, 269—279 (1969).
33. *Levitt M., Warshel A.*, Nature (London), **253**, 694—698 (1975).
34. *Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **303**, 211—229 (1973).
35. *Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A.*, Isr. J. Chem., **11**, 121—152 (1973).
36. *McCammon J. A., Gelin B. R., Karplus M.*, Nature (London), **267**, 585—590 (1977).
37. *Мельников П. Н., Ахмедов Н. А., Липкинд Г. М., Попов Е. М.* — Биоорг. химия, 1976, т. 2, с. 28—42.
38. *Metropolis N. A., Rosenbluth A. W., Rosenbluth M. N., Teller A. H., Teller E.*, J. Chem. Phys., **21**, 1087—1092 (1953).
39. *Miller M. H., Scheraga H. A.*, J. Polym. Sci. (Polymer Simposia), **54**, 171—200 (1976).
40. *Miller W. G., Brant D. A., Flory P. J.*, J. Mol. Biol., **23**, 67—80 (1967).
41. *Momany F. A.*, J. Am. Chem. Soc., **98**, 2990—2996 (1976).
42. *Momany F. A.*, J. Am. Chem. Soc., **98**, 2996—300 (1976).
43. *Momany F. A.*, Bichem. Biophys. Res Commun., **75**, 1098—1103 (1977).
44. *Nemethy G., Scheraga H. A.*, Quart. Rev. Biophys., **10**, 239—352 (1977).
45. *Nishikawa K., Momany F. A., Scheraga H. A.*, Macromolecules, **7**, 797—806 (1974).
46. *Okuyama K., Tanaka N., Ashida T., Kakudo M.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **49**, 1805—1810 (1973).
47. *Ooi T., Nishikawa K.*, The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, **5**, 173—187 (1973).
48. *Pain R. H., Robson B.*, Nature (lond.), **227**, 62—63 (1979).
49. *Phillips D. C.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **57**, 484—495 (1967).
50. *Pincus M. R., Zimmerman S. A., Scheraga H. A.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 4261—4265 (1976).
51. *Platt E., Robson B.*, In: Computing in Biological Science, Geisow M. J., Barrett A. N. (Eds.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, p. 91—131 (1983).
52. *Premilat S., Hermans J.*, J. Chem. Phys., **59**, 2602—2610 (1973).
53. *Premilat S., Maigret B.*, C. R. Sci. Paris, C, **282**, 225—228 (1976).
54. *Птицин О. Б., Рашин А. А.* — ДАН СССР, 1973, с. 473—488.
55. *Ptitsyn O. B., Rashin A. A.*, Biophys. Chem., **3**, 1—20 (1975).
56. *Ralston E., De Coen, Walter R.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **71**, 1142—1144 (1974).
57. *Ramachandran C. N., Mitra A. K.*, J. Mol. Biol., **107**, 85—92 (1976).
58. *Robson B.*, Biochem. J., **141**, 853—867 (1974).
59. *Robson B.*, Trends Biochem. Sci., **3**, 49—51 (1976).
60. *Robson B.*, Trends Biochem. Sci., 7, 240—244 (1980).
61. *Robson B., Garnier J.*, Introduction to Proteins and Protein Engineering, Elsevier Biomedical Press, 1986.
62. *Robson B., Osguthorpe D. J.*, J. Mol. Biol., **132**, 19—51 (1979).
63. *Robson B., Pain R. H.*, J. Mol. Biol., 58, 237—259 (1971).
64. *Robson B., Suzuki E.*, J. Mol. Biol., **107**, 327—356 (1976).
65. *Robson B., Timms D.*, Trends Biochem. Sci., **7**, 240—244 (1980).
66. *Robson B., Hiller I. H., Guest M.*, Chem. Soc. Faraday Trans. II, **74**, 1311—1317 (1978).
67. *Robson B., Stern P. S., Hillier I. H., Osguthorpe D. J., Hagler A. T.*, J. Chimie Phys., **76**, 8319834 (1979).
68. *Rossky P. J., Rahman A.*, Cecam Workshop Models for Protein Dynamics (Cecam Report, Orsay, Paris), 107—152 (1976).

69. *Smith G. D., Griffith J. F.*, Science, **199**, 12141216 (1978).
70. *Sternberg M. J. E.*, In Computing in Biological Science, Geisow M. J., Barrett A. N. (Eds.), Elsevier Biomedical Press, 143—177, 1983.
71. *Sternberg M. J. E., Cohen F. E.*, Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B, **293** (1063), 177—189 (1981).
72. *Swenson M. K., Burgess A. W., Scheraga H. A.*, Symposium on Frontiers in Physico-chemical Biology, Paris, 1977.
73. *Tanaka S., Scheraga H. A.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**, 3802—3806 (1975).
74. *Warme P. K., Scheraga H. A.*, Biochemistry, **13**, 757—767 (1974).
75. *Warme P. K., Momany F. A., Rumball S. V., Tuttle R. W., Scheraga H. A.*, Biochemistry, **13**, 768—782 (1974).
76. *White N. J., Morrow C.*, Computers and Chemistry, **3**, 33—48 (1979).
77. *Zimmerman S. S., Scheraga H. A.*, Macromolecules, **9**, 408—416 (1976).
78. *Zimmerman S. S., Scheraga H. A.*, Biopolymers, **16**, 811—843, 1977.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авторадиография 226, 235, 308, 313
Азобензолсульфенилбромид 89
Акриламид 18, 28, 29, 44, 472
полимеры на основе 28, 400, 440—448; *см. также* Электрофорез
Алкилалкантиосульфонаты 90
Алкилирование 16, 61, 427
Аллизин 69
Альбумин бычий сывороточный 290, 293, 297, 298, 300
Альдимины 68—72
Амидинирование 55, 56, 61
Амидирование 441, 457, 485—487
Амидочерный 311
Амиды аминокислот 95, 255—257, 279, 358, 369, 398, 522—525
Аминогруппы (на твердой фазе) 313—316, 385—386
Аминокислота N-концевая, анализ 26, 35, 36, 355
— — реакции блокирования 17, 35, 526
— С-концевая, алкоголиз оксазолов 499—500
— — анализ 454—455, 481—511
— — введение трития 488—493
— — восстановление 496—497
— — гидразинолиз 493—496
— — иминотиазолидин 121
— — образование альдегида 497
— — тиоционатное расщепление 454, 501—504
— — цианамидное расщепление 504—506
Аминокислотный анализ 63, 72, 291
ГЖХ 257, 285—290
ВЭЖХ 281—285
ионообменная хроматография 253, 256, 258—259, 262—263, 265, 275—278, 322—323
тонкослойная хроматография 271—272
Аминокислоты, модификация постколоночная 275—278
— модификация предколоночная 265, 271—279
α-Амино-β-(ε-N-L-лизин)пропионовая кислота; *см.* Лизиноаланин
Аминопептидазы 92, 246
β-Аминопропионитрил 70
Аминосахара 318—325
Аминоспирты 496—497
2-Аминоэтаноламин 280
Аминоэтилирование 87, 101, 143, 149
S-Аминоэтилцистеин 87, 154, 493
Аммиак, определение 255—256
Аммоний сульфат, номограмма 49
Амфолиты 248
Анионный обмен 40, 41, 256, 259, 262—263, 265, 354—356, 482—483, 493, 495
Антитела 190—192
блоттинг 311—313
Аргинин, модификация 145—146, 344
— обнаружение 269, 361
— определение 260—261, 285
— пептиды 147, 148, 152—155, 388—389, 391, 483, 484—485, 493, 517—518; *см. также* Пептидная связь, расщепление
ФТГ 405, 410 и далее, 414—415, 417
Арилсульфенилгалогениды 89
Аспарагин 255—257, 270—271, 273, 282—284, 398, 452, 496, 511, 524; *см. также* Амиды аминокислот, Пептидная связь, расщепление
Аспарагиновая кислота 264—265, 284, 445—446, 488, 490, 496, 502, 506; *см. также* Амиды аминокислот, Аминокислотный анализ, Пептидная связь, расщепление
Аспарагиновая кислота, ФТГ 415
Атомно-абсорбционная спектроскопия 299—300
Аффинная хроматография 152, 180—195, 226
иммобилизованные антитела 187—189, 190—192
иммобилизованные кофакторы ферментов 189—190
иммобилизованные лектины 187
Ацетилирование 318—321, 447, 501, 519
Ацетилхлорид 289
Ацетильные группы 266—267
Ацилазиды 52
Ацилирование 289, 318—321, 447, 501, 519
N→O-Ацильная миграция 93, 101, 456
Ацетон, очистка 376
Ацетонитрил, очистка 376

Белки
агрегация 26
аминокислотный анализ 63, 72, 271—290
восстановление 70, 84
концентрирование 56, 169, 226, 246—249, 293, 474
липиды в белках 74, 299
методы идентификации 17
мономеры 15—20, 25, 26, 35, 37, 56, 64
окисление 90—92
олигомеры 15—20, 35, 51, 52, 56
определение 290—302
потери 226, 247—249, 302
радиоактивная метка 58, 60—62
растворимость 48, 86, 139, 247, 254, 299, 350, 357, 388, 390, 392, 428, 446
растворители 91, 247, 348, 350, 361, 386—388, 426—427, 490, 502—503
реокисление 67, 68
реконструкция (самосборка) 58—60, 100
стехиометрия 50—52
структура, предсказание 559—604
углеводы в белках 24, 33, 252, 257, 260, 317—323
химическая модификация 45, 57—59, 61, 66

Биодеградация 183, 185
Бисиминоэфиры 52—57
Биуретовая реакция 247, 291, 296—297
Бифункциональные реагенты 52—57
Блоттинг *см.* Электроперенос
Браунитцера реагент 35, 457
Бредфорда метод 292, 297—298
Бром 102
N-Бромоацетамид 102
α-Бромо-2,3,4,5,6-пентафторотолуол 267
N-Бромосукцинимид 102, 114, 115—117, 124, 278
Бромотирозин 111
Бромофеноловый синий 18, 31, 226
Бромофтальимид 102
Бромоциан 93, 96—101, 111, 112, 152, 168—171, 175, 183, 191, 230, 347—348, 383, 484
2-Бромоэтансульфонат 88
2-Бромоэтилтриметиламмонийбромид 88, **143**
БТИ 257
БУВП 351—352, 357, 361—362, 490
2,3-Бутандион 145
трет-Бутилоксикарбонил 447
трет-Бутилоксикарбонилоксиимино-2-фенилацетонитрил 444
н-Бутилстеарат 257
Бутилхлорид 431
Буферные растворы, контроль чистоты 275
— — летучие буферы 37, 140, 284, 457, 495, 522
— — непрерывные и ступенчатые буферные системы 27, 30—32, 473—474

Вакуум, утечка 432—433
4-Винилпиридин 48—49
Внутренние стандарты
амид аланина 486
2-аминоэтанол 281
н-бутилстеарат 257
гомоаргинин 275, 288
диаминопимелиновая кислота 275
инозит 320
[^{35}S]иммуноглобулин 434
β-карбоксиаспарагиновая кислота 265
5-метилтриптофан 252
миоглобин 434—435, 471
нитротирозин 275
норвалин 275
норлейцин 275, 288, 410
пипеколиновая кислота 288
таурин 486
транэксамовая кислота 288
[^{14}C]цистеиновая кислота 265
Вода, очистка 245, 377
Вторичная структура 585—588
Высаливание 48—49
ВЭЖХ 26, 36, 38, 197—200, 212, 235—240, 334—341, 406—**417**
белков 207
контроль 229, 231, 235, 239—240
пептидов 214 и далее, 224, 235—239
получение производных 237, 278—285
специальные носители
Agarose 201
Bioseries 214
Cyanopropyl 421
Glycophase 201
Lichrosorb 201, 210—211, 247
Lichrosphere 201—202
Mono P, Q, S 220—221
Nucleosil 5SB 257
Partisil-10 213, 263
Sepharose 198
Spherisorb 261
Spheron 201
Synchrom 263
Synchropak 201
Toyo Soda 200—201, 203, 204, 206—208
Ultragel 198
Ultrapore 214—215
Ultrasphere 280, 281—282, 414
Vydac 210, 214, 217, 218
Waters μ Bondapak 414
Waters I Series 203, 205, 206
Zorbax 214, 410—414, 415

Газожидкостная хроматография
альдитов 321—322
аминокислот 285—290
аминосахаров 317—323
аспарагина 257
глутамина 257
иминогидантоинов 505
тиогидантоинов 504
фенилтиогидантоинов 417, 431
N-формиламинокислот 257
Гамильтона уравнение 566—569, 571, 577
Гексафтороацетон 503
Гель-фильтрация 21, 32, 37
общий объем 21, 24
свободный объем 21, 24
Гептафторобутириламинокислот изобутиловые эфиры 289—290
Гептафторомасляная кислота 111, 427, 431, 456
Гибридизация 57—58
Гидразиды 94, 494
Гидразин 94, 388, 493—496, 519
Гидрид, очистка 517—519
Гидроксамовые кислоты 94
Гидроксилизин 69
Гидроксиальдольгистидин 69
2-Гидрокси-5-нитробензилбромид 254—255
Гидроксиоксазолидин 94
Гидроксипролин 278, 282—283, 284
Гидролиз, кислотный 249—252, 367, 418
— — 224, 255—256, 261—262, 264; *см. также* Меркантоэтансульфо-, Метансульфо- и *п*-Толуолсульфокислоты
— щелочной 22—23, 250, 252—253, 264
Гистидилгидроксимеродесмозин 69
Гистидин, расщепление пептидных связей 102, 113, 114, 118, 124, 358
— обнаружение 270, 361
— определение 257, 284, 285
— ФТГ 410—412, 415, 417—418
Гистоны 117, 303
Гликопротеины 317—323
Глицерин 18, 30, 31, 59, 228, 245, 322, 473
Глутамин 95, 255—257, 285, 396, 446, 496
— циклизация 342, 373, 452, 481, 525
Глутаминовая кислота 95, 96, 285, 445, 491, 495—496
— — ФТГ 415
— — γ-эфиры 122
Глутаровый альдегид 52
Голубое тонирование 310
Гомоаргинин 288
Гомосерин 96, 97, 104, 284, 398
— лактон 96, 97, 348, 446, 484
— пептиды 390—391, 400, 484
Гомоцистеиновая кислота 260
Гомоцистин 260
Градиент pH 46, 355
Градуировка гелевой кислоты 24, 25
Гуанидил-HCl, получение 34

ДАБИТЦ 377, 405, 419
ДАБИТЦ — ФИТЦ 358, 368, 395, 398, 402, 419—424
Дансиламинокислоты 279, 334, 366—372
маркеры 370—371
Дансилирование 343, 366—372
— *Эдмана* метод 353, 358—359, 366—372, 374, 521—522
Двойное окрашивание 309
Деамидирование 16, 96, 107, 126, 127, 255, 446
Деаминирование 382
Дейтерии 489, 525—526
Декстран голубой 23, 199
Делипидизация 213, 248, 297, 299
Денатурация 49, 120, 139
Денатурирующие агенты 25, 32, 37, 58, 60, 65, 84, 100, 139, 172, 191—192, 220, 248, 259, 350
Денситометрия 60, 62
Десмозин 68, 72
Десульфирование 121
Детектирование, методы 268—271
аминогрупп 315, 385—386
аргинина 260—261, 269
аспарагина 270
гистидина 262
детергента, удаление 249
карбодиимидов 316
γ-карбоксиглутаминовой кислоты 264—265
нингидрин 255, 262, 265, 268—269, 363
основания, избытка 519—520
сахаров 227, 271, 321—322
тирозина 270
триптофана 270
УФ-область 268, 363
флуорескамин 268, 363
о-фталевый альдегид 263, 265, 268, 270
фосфатов 271
фосфоаминокислот 261—264
Диагональное картирование 101, 176—177, 264, 344, 348, 484—487
Диализ 18, 29, 58, 59, 60, 62, 66, 71—76, 86—88, 120, 172, 246, 247, 255, 257, 473—474
1,2-Диаминомасляная кислота 257
Диаминометан 146
2,3-Диаминопропионовая кислота 257
1,2-Диаминоэтан 146
Диамины 447
Диамминсеребро, комплекс 305—306, 308—310
γ,ε-Дигидроксилейцин 128
Диизопропилфторофосфат 141, 148, 150—153, 157
Дикетопиперазин 94, 95
N,N-Диметилаллиламин 425—429, 432
Диметиламиноазобензол-4′-изотиоцианат *см.* ДАБИТЦ
Диметиламиноазобензолтиогидантоины 279, 419—424, 451
Диметилмалеилангидрид 59, 60
Диметиловый эфир иминоадипиновой кислоты 54, 55
— — иминомалоновой кислоты 54
— — иминопробковой кислоты 54
— — иминоянтарной кислоты 54
Диметилсульфоксид 103, 109—111, 127
Диметилформамид, очистка 376
2,4-Динитрофторобензол 312, 494
N,N-ди-*н*-Пропил-L-аланин 335
Диссоциация белков 58, 60
Дисульфидные связи 15, 25, 26, 34, 61, 64—69, 83—87, 91, 118, 165—178, 204—208
алкилирование 16, 26, 83—84, 142—143, 168, 169, 208, 258, 348—349
анализ 174, 257—260
восстановление 26, 27, 34, 64—65, 84—87, 204, 208, 349, 426—427
обмен 25, 94—95, 158
окисление 64, 90, 142, 204, 208, 349, 426—427
5,5′-Дитиобис(2-нитробензойная кислота); *см.* *Эллмана* реагент
Дитиотреит 85, 88
1,2-Дихлороэтан, очистка 376
ДСН 27—32, 35, 44, 151, 185, 228, 232, 294—296, 248—299, 305, 313, 389, 401, 426, 463, 473—474, 479, 509
очистка 28—29, 472
удаление 248

Жидкофазный анализ последовательности 425—436, 448—460
контроль процесса 434—435

Изомеры аминокислот 334—341
— дансиламинокислот 279, 334
Изопептиды 69, 72
N^{ε}-(β-аспартил)лизин 72
N^{ε}-(γ-глутамил)лизин 68, 72
Изотахофорез 246
Изотопное разбавление 35
Изоэлектрические точки 40, 45—47, 50
Изоэлектрическое фокусирование 39, 40, 45—48, 304, 308, 539
Имидазолы 270
Имидоэфиры 499
Иминотиазолидин 121
Иминогидантоины 505
Иммобилизация на твердой фазе 55, 386 и далее, 443—448
контроль 313—316, 385—386, 392—393
Индийские чернила 311
Иодирование 229, 271
Иодоацетамид 169, 297, 417
Иодобензол, бис(1,1-трифтороацетокси) 257
Иодоводородная кислота 418, 430
о-Иодозобензойная кислота 112
N-Иодосукцинимид 118
Иодоуксусная кислота 169, 348—349; *см. также* Дисульфидные связи, Алкилирование
Ионная сила 48, 201—203
Ионообменная хроматография 39—43, 220—222, 224, 239, 248, 262—263, 272—275, 322—323, 354—356, 482; *см. также* Анионный обмен, Катионный обмен
Ионопарная хроматография 261, 264
экстракция 248

Карбамилирование 16—17, 33
Карбодиимид 146, 316—317, 377, 388, 391—392, 400, 445—446, 483, 485—486, 489, 497—499, 502, 505
β-Карбоксиаспарагиновая кислота 265
γ-Карбоксиглутаминовая кислота 264—265, 527
Карбоксильные группы активированные 497
модификация 146
анализ С-концевой последовательности 481 и далее
Карбоксиметилирование 142, 258, 426
S-Карбоксиметилцистеин 65, 73, 151, 168, 258, 280—282, 351, 369, 417, 481, 493

Карбоксипептидазы 483, 487, 507—511
Катионный обмен 39—41, 253, 262—263, 265, 272—275, 334, 337, 352—355, 482, 493, 495—496, 503, 522
Квадрол 426—427, 428—429, 456—457
очистка 429
Кинуренин 74, 114
Кливленда метод картирования 224, 226—231
Клострипаин 151, 344
Конвея метод 255—256
Коэффициент распределения 24, 199
15-Краун-5-эфир 267
Кристаллизация 537—542
Кристаллографические потенциальные функции 591—595
Кумасси голубой 62, 76, 292, 297—298, 312
Кьельдаля метод 256, 290—291

Леммли ступенчатый буфер 30, 228, 473; *см. также* Электрофорез
Лизин, модификация 59, 143—145, 148, 154, 278, 344
Лизиноаланин 125, 252—253, 322, 323
Лизинсодержащие пептиды 386—389, 391—392, 446—447, 457, 488
Лиотропный ряд 48
Липопротеины 74; *см. также* Делипидизация
Лития гидроксид 253
Лоури метод 291, 293, 296

Малеилирование 59, 144—145, 148, 172—173, 344, 360, 483
Малоновый ангидрид 145
Масс-спектрометрия 72, 198, 289, 321, 353, 406, 454, 459, 504, 515—529
— бомбардировка ускоренными атомами 528
Мембранные барьеры 246—248
Мембраны Millipore 251, 261, 280, 409
Меркаптоэтанол 87
Меркаптоэтансульфокислота 252—253
Метанолиз 318
Метансульфокислота 252, 254, 258, 281, 418, 488
N-Метилглутамин 73
Метиленбисакриламид 18, 22, 28, 44
Метилизотиоцианат 388
Метилиодид 517, 519—520
Метилметантиолсульфонат 90
Метилтиоцианат 96—97
5-Метилтриптофан 252
S-Метилцистеин 126—127
Метионин, расщепление пептидных связей 96—101, 170, 177, 230, 345—348
метилсульфониевая соль 260
— обнаружение 270
— определение 257, 260, 281
— пептиды 96, 101, 105, 361
— S-оксид 73, 99, 98—111, 114, 260, 281, 284, 348
— S,S-диоксид (сульфон) 73, 99, 102, 249, 258, 260, 284
Микроконцентратор 248
Минимизация 578—580
Модели, построение 544—546
— мягких сфер 562
— твердых сфер 560
Молекулярная масса, определение 21, 24, 26, 30, 32, 34, 204—205
Монте-Карло метод 573—576, 580

Мочевина 33, 84, 102, 113, 192, 296, 305, 348, 350, 509
очистка 33
удаление 206, 247, 254

Надмуравьиная кислота 90—92, 127, 257—258, 349, 361
α-Нафтол 260, 269
Никель *Ренея* 121, 177
Нингидрин 255, 262, 265, 268—269, 275—276, 351, 357, 362—363, 393
Нитромалоновый альдегид 145
2-Нитро-5-тиобензойная кислота 258—259
2-Нитро-5-тиосульфобензойная кислота 258—259
2-Нитро-5-тиоцианобензойная кислота 119—121, 177—178
β-Нитрофенилглиоксаль 261
Норлейцин 275, 288
Нуклеиновые кислоты 479, 481—482, 522

Обессоливание 48, 49, 75, 76, 209, 211, 213, 216, 248, 367, 503
Обесцвечивание гелей 19, 302—311
Объем жидкости между частицами 199
Объем пор, общий 199, 201
Объем элюирования 21—24
Озонолиз 114
Окрашивание гелей
комплексами серебра 19, 302—311
кумасси голубым 19, 38, 47, 62, 226, 302—311, 473
«Окрашивание» образцов в электронной микроскопии 551—554
Оксазол 499
Оксазолидон 506
O→N-миграция 342, 481
Осаждение белков органическими растворителями 91
— — солями 226
— — трихлоруксусной кислотой 91, 169, 232, 246, 248—249, 294
«Отпечатков пальцев» метод 224, 231—235, 351, 360—363
Оттенение 554
ОФ-ВЭЖХ 197, 207—222, 237—239, 334, 338, 472—473
Очистка реагентов и растворителей 284, 376—378, 517—518

Папаин 158, 159, 227, 228
Паули реагент 270
Пепсин 158, 169, 346, 359
Пептидные связи, расщепление
аминоэтилцистеин 154
аргинин 147, 148, 151—155, 388, 483—485, 493, 517, 518
Arg—Ala 150
Arg—Arg 150, 152, 153
Arg—Asp 150
Arg—Cys 150
Arg—Gly 150
Arg—His 150
Arg—Ile 154
Arg—Leu 154
Arg—Lys 154
Arg—Pro 147, 154
Arg—Val 153, 154
аспарагин
Asn—Ala 346

Asn—Gly 122, **346, 359, 481**
Asn—Leu 346
Asn—Pro 346
аспарагиновая кислота **127, 149, 151, 228**
Asp—His 511
Asp—Pro 16, **37, 93, 107, 230, 347, 511**
ацилиминотиазолидин **121**
валин
Val—Ile 92
Val—Lys 484
Val—Trp 253
гистидин 102, 113, **114, 118, 124, 126, 127**
глицил—Trp 104
глутамин 359
Gln—Gly 122
глутаминовая кислота **151, 158, 171, 228**
дегидроаланин 124—127
диоксоиндолилаланинлактон 103—107
изолейцин
Ile—Ile 92
Ile—Trp 253
лейцин 156
Leu—Pro 156
лизин 147, 152—155
Lys—Pro 147
метионин
Met—Cys—Lys 347
Met—Glu 347
Met—Ser 98, 347—348
Met—Thr 98, 347—348
неспецифическое расщепление 93—94, 122—123, 126—127, 151, 155
пролин 122, 155—156
Pro—Aec 154
Pro—Ile 157
Pro—Lys 154
Pro—Pro 155
Pro—Thr 156
серин 124, 127, 151
тиоцианоаланин 120
тирозин 102, 112, 118, 124, 126—127, 156, 157
Tyr—His 485
Tyr—Pro 156
треонин 127
триптофан 95, 100—115, 126—127, 157, 230, 347, 359
Trp—Pro 156
фенилаланин 157—159
Phe—Pro 157
Phe—Ser 347
Phe—Thr 347
цистеин 118, 119, 124, 177—178
цистин 118, 119, 124
Пептиды, элюирование 363
— картирование 223—240, 259, 351—364
— контроль чистоты 235, 353, 357
— окрашивание 363
— разделение 351—364; *см. также* Детектирование, методы, Нингидрин, Флуорескамин
— структура, предсказание 559—604
Пептиды С-концевые 61
оксиндолил 109
фосфорилированные 261; *см. также* Аргинин, Гомосерин, Лизин, Метионин, Тирозин, Цистеин, Цистин
Периодат 260
Перметилирование 519—520
О-Пивалоилпептидогидроксамат 497—499
Пипеколиновая кислота 288
Пироглутаминовая кислота 72—73, 95, 96, 213, 265, 452, 481, 525
S-Пиридилэтилсодержащие белки 88, 93, 143
Пиридин 262, 284, 356, 363—364, 372, 376
Пиромеллитовая кислота 190
Плазма, очистка 288
Подготовка образца 213, 425—428, 471—474
Полиакриламидные гели 29
элюирование 39; *см. также* Электрофорез, ДСН—ПААГ
Полиамидные пластинки 262, 359, 366—372, 504
Полибрен 417, 425, 428—429, 430, 458, 464, 476
Полистирольная смола 272, 337, 377, 379 и далее, 440, 442—443
Полификс D 244
Пролин 276, 278—280, 282, 471, 491, 499, 502, 506
Проназа 257
Постпролинспецифичная протеаза 155—156
Протеаза подчелюстной железы 153
Протеазы с высокой специфичностью 146—156
с низкой специфичностью 156—160
— *Armillaria mellea* 153, 344
— *Crotalus atrok* 159—160
— *S. griseus* 261
— *Mykobacter AL1* 154—155
— *Staph. aureus* 150, 151, 170, 171, 227, 228, 232, 346, 358—359

Радиоактивное мечение 35—37, 169, 226, 231, 246, 261, 265, 402, 426, 451, 459, 488—493
Разрешение в хроматографии 199
— — электронной микроскопии 547—548
Расширенная теория *Хюккеля* 570
Реактор вращающийся 430, 456, 469, 476
Реакции присоединения 386—393, 443—449, 455, 476
Рецепторы гормонов 192

Сакагучи реакция 260, 269
Сахара 317—323
Сахароза 228
Секвенатор газофазный 375, 464—479
Серин, ФТГ 415, 418, 431, 449, 452
Серусодержащие аминокислоты 258
Сефароза 4В голубая 190
Силанизация 244
Скоростная хроматография белков 220—222, 239
Скоростной вакуумный концентратор 246, 251
Соляная кислота, очистка 245
Стекло, очистка 244—245
Стекло CPG 199, 201
Сукцинилирование 57—59
Сульфоны 64, 66, 67, 88
Сульфиний-ионы 95
Сульфитолиз 66—67
S-Сульфобензилцистеин 66, 67
Сульфобромофталеин 292, 298—299
Сульфофенилизотиоцианат 35, 457
S-Сульфоцистеин 66, 67, 91, 258

Твердофазный анализ последовательности 374—402, 437—452, 501
прибор и программа анализа 393—399
ТЕМЕД 28—31, 44
Тепловая диагональная техника 264
Термолизин 157, 158, 169—171, 176, 346
Тетратионат 258
Тетрафторосукцинилирование 144

Тиазолиноны 342—343, 375, 395—399, 415, 449—450, 452—454, 476
Тиоацилирование 452—454
Тиогидантоины 454—455, 501—504
Тиогликолевая кислота 257—260, 296—297
Тиольные группы 25, 84—91, 257—260, 296—297
реокисление 67, 68
Тиоцианатное расщепление 501—504
Тиоцианоаланин 119, 120
Тирозин 94, 110, 114, 361
иодирование 229
обнаружение 270, 300, 361
определение 257, 300—302
пептиды 105, 116, 353
производные 68, 90, 100, 111, 114, 116, 250
L-(1-Тозиламидо-2-фенил)этилхлорометилкетон 147
Тозилирование 125
п-Толуолсульфокислота 110
Тонкослойная хроматография
альдитов 321—322
аминокислот 271—272
ДАБТГ-аминокислот 421—422
дансиламинокислот 367—371
иминогидантоинов 505
γ-карбоксиглутаминовой кислоты 265
пептидов 353
тиогидантоинов 502—504
фенилтиогидантоинов 406, 417
фосфоаминокислот 236
Транспептидация 95—96, 126
Треонин 94, 281
ФТГ 415, 416, 431, 452
Третичная структура 595—598
Трибромокрезол 113, 114
Трибутилфосфин 86—88
Триметилсилилирование 285, 318—320, 504
2,4,6-Тринитробензолсульфокислота 256, 299, 316, 385
Трипсин 87, 147—149, 169—173, 175, 224, 231, 236, 237—238, 261—262, 344, 346, 350, 359, 483
Триптофан, расщепление пептидных связей 102—115, 230, 347—348
— обнаружение 270, 300, 348—349
— определение 253, 257, 320—323
— пептиды 107—116, 124, 348, 353, 361, 363, 369, 522
Тритиевая метка 69, 70, 488—493
Трифтороацетилирование 145, 149, 154
Трифтороуксусная кислота, очистка 377, 449—450
Трихлороуксусная кислота 56
Тромбин 149—150

Фармалиты 248
Фенилгидразин 127
п-Фенилендиизотиоцианат 377, 386—391, 446
Фенилизотиоцианат 428—430
очистка 372, 377, 419
радиоактивно меченный 35, 36, 284, 451, 459
реакция с аминокислотами 283—285, 342
Фенилтиогидантоины аминокислот 395—402, 405—418
обратный гидролиз 405, 418, 430, 454
Фенилтиогидантоин S-β-(4-пиридилэтил)цистеина 88
Фенилтиокарбамиламинокислоты 283—285, 392
Фенилтиокарбамилпептиды 366, 372
Фенилтиомочевина 417
Ферментативный гидролиз 135—160, 349—351, 359—360
контроль процесса 141
остановка гидролиза 141, 148, 170
Флуорескамин 268, 276, 357, 360, 362—363
ФМСФ 141, 148, 150, 157
Фолина — Чикольте реагент 292, 293—294
Формилирование 526
N-Формилкинуренин 90
пептиды 114, 115
Формильные группы 266—268, 481
Фосфаты 271
Фосфоаминокислоты 261—264
Фотографирование гелей после окрашивания 20, 304—307
о-Фталевый альдегид 171, 263, 265, 268, 278, 278—283, 335, 337
4-Фторо-7-нитробензо-1,2,3-оксадиазол 278

Хаотропные агенты 217; *см. также* Денатурирующие агенты
Химические методы модификации 142—146; *см. также* Аминоэтилирование, Малеилирование, Сукцинилирование, Тетрафторосукцинилирование, Трифтороацетилирование
Химические методы расщепления 82, 118, 230, 344—348
Химотрипсин 156—159, 170—172, 224, 228, 231, 346, 350, 359
пептиды 522
п-Хлоромеркурибензоат 260
7-Хлоро-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол 278, 334
4-Хлоро-7-нитробензофуран 280, 282—283
N-Хлоросукцинимид 113, 114
Хроматографические колонки 21—24
миниколонки 211, 213, 247
патроны Sep-Pac 206, 211, 213, 247, 409
Хроматографические носители общего типа
агароза 22, 182, 183, 307—310
акриламид 22, 182, 183, 198, 334; *см. также* Электрофорез, ДСН—ПААГ
полисахариды 39—41, 182, 183, 198
полистирол 334, 377, 379—382, 439—448
стекло 182, 184, 439; *см. также* CPG
Хроматографические носители специальные
биогель 22, 33, 76, 85, 198, 348, 351, 353
сефадекс 22—25, 37, 46, 113, 173, 198, 502
— G-10 48, 76, 85
— G-25 22, 75, 114, 184, 191, 254, 353
— G-50 60, 75, 353, 361
— G-75 47, 181
— G-100 117, 182
— СП-G-50 150
сефароза 22, 23, 33, 55, 152, 190—191
Хроматография (контроль процесса)
анализ элюата 23
нингидрин 23, 171, 267—269, 496
радиоактивность, измерение 23, 36, 240, 261—264, 348—349, 351, 417, 434, 459
спектроскопия 34, 40, 41, 240, 263, 348, 353
флуоресценция 23, 240, 261, 263, 268, 276—283, 357
химическая модификация 23, 299
хемилюминесценция 279; *см. также* Детектирование, методы
Хроматография на бумаге 235, 351—353, 356, 360—364
Хроматофокусирование 39, 221

Цианат ион 16, 33
Цианилирование 59
Циклогександион 145, 146, 344

Цистеин 149—150, 154, 177—178, 257—260, 281, 335, 342, 349, 493
обнаружение 270, 278, 423
пептиды 348, 457
3-сульфиноаланин 259
ФТГ-Cys 417
Цистеиновая кислота 90, 92, 100, 102, 108, 114, 173, 249, 257—259, 265, 278, 280, 284, 335, 493
Цистин 165—178, 257—259, 270, 275, 284, 335, 493
пептиды 125, 173—177
Цитраконилирование 59, 139, 144, 148—149

Эвристические методы 582—585
Эдмана метод 35, 36, 96, 121, 175, 177, 278, 283, 342—343, 352—353, 370—372, 374 и далее, 402, 405, 415, 417, 425, 437—452, 464—479, 482
стадия циклизации 36, 342—343, 388, 350
Эластаза 159, 170, 228, 346
Электродиализ 76
Электронная микроскопия 546—558
Электроперенос на диазотированную бумагу 229—231
— — нитроцеллюлозу 229, 231, 311—313
Электрофорез 17—20, 232—234, 246, 351—352, 356—357, 360—363
буферы 27, 30, 44, 352
геля, калибровка 18, 20, 30
ДСН—ПААГ 17—20, 27—32, 38, 43, 44—45, 47, 52, 57, 62, 223, 226—227, 302—311, 349, 434, 471—473, 478
концентрирующий гель 30, 31, 39, 44, 47, 228
маркеры 362, 486
на бумаге 233, 235, 351—353, 356—357, 361—363, 486, 487
обнаружение, KCl 38
— кумасси голубым 19, 38, 47, 62, 226, 302—311, 473
— натрия ацетатом 38
— солями серебра 19, 302—311
разделяющий гель 30, 31, 44
фотографирование геля 20, 304—307, 309—310, 313
Эллмана реагент 89, 119, 169, 170, 174, 259
Элюирование в градиенте буфера 42
Элюирования объем 202
Энантиомеры аминокислот *см.* Изомеры аминокислот
Эрлиха реагент 270
Этаноламин, очистка 376
Этилацетат 441
Этерификация 285, 288—289, 415—416
Этиленимин 87, 101, 143, 154, 349
S-Этилтиолтрифтороацетат 145

ОГЛАВЛЕНИЕ

От переводчиков 5

Предисловие 7

Литература 9

Вместо введения 10

Некоторые сокращения и обозначения, принятые в книге 13

Глава 1. Определение состава белковых олигомеров. Получение мономеров и полипептидных цепей 15

1.1. Введение 15
1.2. Методы идентификации олигомеров 17
1.2.1. Электрофорез в градиенте ПААГ 17
1.2.2. Гель-фильтрация 21
1.3. Идентификация мономеров 25
1.3.1. Методы определения молекулярной массы мономеров . . 26
1.3.2. Методы выделения мономеров 37
1.4. Стехиометрическое соотношение мономеров в олигомере . . 50
1.4.1. Определение состава олигомера по молекулярным массам мономеров 51
1.4.2. Сшивание субъединиц бифункциональными реагентами 52
1.4.3. Гибридизация 57
1.4.4. Диссоциация и сборка 58
1.4.5. Электрофорез в полиакриламидном геле 60
1.4.6. Аминокислотный анализ 63
1.5. Сшивание олигомера и мономера 63
1.5.1. Дисульфидные связи 64
1.5.2. Другие типы поперечных связей в белках 68
1.6. Получение мономеров с целью секвенирования 72
1.6.1. Гидролиз N-концевой пироглутаминовой кислоты . . . 72
1.6.2. Восстановление сульфоксидов N-метилмеркаптоацетамидом 73
1.6.3. Техника работы с липопротеинами 74
1.6.4. Отщепление олигосахаридных фрагментов гликопротеинов 74
1.6.5. Обессоливание 75
Литература 76

Глава 2. Фрагментация полипептидов химическими методами . . . 82

2.1. Введение 82
2.2. Расщепление дисульфидных связей 83
2.2.1. Восстановление и S-карбоксиметилирование 83

2.2.2. Другие защитные группы (по SH-группе) 86
2.2.3. Расщепление S—S-групп путем окисления 90
2.2.4. Реакция с сульфитом 91
2.3. Частичный кислотный гидролиз 92
2.3.1. Расщепление связи Asp-Pro 93
2.3.2. N→O-ацильная миграция 93
2.3.3. Побочные реакции 95
2.4. Расщепление по остатку метионина 96
2.4.1. Бромоциан 96
2.4.2. Другие реагенты 101
2.5. Расщепление по остатку триптофана 101
2.5.1. Окислительное галогенирование 102
2.5.2. Расщепление с помощью BNPS-скатола 108
2.5.3. Расщепление по остатку триптофана в системе ДМСО — галогеноводородные кислоты 109
2.5.4. Расщепление по остатку триптофана бромоцианом в гептафтормасляной кислоте 111
2.5.5. Расщепление по остатку триптофана *о*-иодозобензойной кислотой 112
2.5.6. Другие реагенты 113
2.5.7. Озонирование 114
2.6. Расщепление по остатку тирозина 116
2.6.1. N-Бромосукцинимид 116
2.6.2. Другие реагенты 118
2.7. Расщепление по остатку цистеина 118
2.7.1. Цианирование с помощью 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислоты 120
2.8. Другие методы химического расщепления пептидных связей 122
2.8.1. Расщепление связи Asn-Gly 122
2.8.2. Расщепление по остатку пролина 123
2.8.3. Расщепление по остатку гистидина 123
2.8.4. Расщепление по остатку дегидроаланина 124
2.8.5. Другие методы расщепления пептидных связей 126
2.9. Заключение 128
Литература 128

Глава 3. Фрагментация полипептидной цепи ферментативными методами

3.1. Введение 135
3.2. Приготовление субстрата 138
3.3. Общие условия ферментативного гидролиза 139
3.3.1. Буферные растворы 140
3.3.2. Соотношение фермент : субстрат 140
3.3.3. Температура 140
3.3.4. Продолжительность ферментативного гидролиза . . . 140
3.3.5. Контроль за процессом ферментативного гидролиза . . 141
3.3.6. Завершение ферментативной реакции 141
3.4. Методы модификации белков 142
3.4.1. Расщепление дисульфидных связей 142
3.4.2. Алкилирование сульфгидрильных групп 142
3.4.3. Модификация остатков лизина 143
3.4.4. Модификация остатков аргинина 145
3.4.5. Модификация карбоксильных групп белка 146
3.5. Протеазы с высокой специфичностью 146
3.5.1. Трипсин 147
3.5.2. Тромбин 149
3.5.3. Протеаза V8 из *Staphylococcus aureus* 150
3.5.4. Клострипаин 151
3.5.5. Протеаза подчелюстной железы 153

3.5.6. Протеаза из *Armillaria mellea* 153
3.5.7. Протеаза II из *Myxobacter* AL1 154
3.5.8. Постпролинспецифичный фермент 155
3.6. Протеазы с низкой специфичностью 156
3.6.1. Химотрипсин 156
3.6.2. Термолизин 157
3.6.3. Пепсин 158
3.6.4. Папаин 158
3.6.5. Эластаза 159
3.6.6. α-Протеаза из *Crotalus atrox* 159
3.6.7. α-Литическая протеаза из *Sorangium sp.* 160
3.7. Заключение 160
Литература 160

Глава 4. Дисульфидные связи 165

4.1. Введение 165
4.2. Принципиальная схема анализа 166
4.3. Определение числа дисульфидных связей 168
4.4. Расщепление полипептидной цепи до коротких цистинсодержащих пептидов 169
4.4.1. Расщепление бромоцианом 170
4.4.2. Гидролиз пепсином 170
4.4.3. Гидролиз трипсином и химотрипсином 170
4.4.4. Гидролиз стафилококковой протеазой 171
4.4.5. Гидролиз термолизином 171
4.4.6. Гидролиз после малеилирования и сукцинилирования . . 172
4.5. Фракционирование цистинсодержащих пептидов 173
4.5.1. Методы фракционирования 173
4.5.2. Обнаружение цистинсодержащих пептидов 173
4.6. Идентификация и локализация цистинсодержащих пептидов 174
4.6.1. Расщепление дисульфидных связей 174
4.6.2. Идентификация по известной аминокислотной последовательности 174
4.6.3. Идентификация дисульфидных связей у белков с неизвестной аминокислотной последовательностью 176
4.6.4. Общие замечания 176
4.7. Специальные методы 176
4.7.1. Красители 176
4.7.2. Диагональное картирование 176
4.7.3. Специфическое расщепление по остаткам цистеина . . 177
Литература 178

Глава 5. Аффинная хроматография белков 180

5.1. Введение 180
5.2. Область применения аффинной хроматографии 180
5.3. Методы приготовления аффинного сорбента 181
5.3.1. Понятие об аффинном сорбенте 181
5.3.2. Материалы-носители 182
5.3.3. Пространственные группы 184
5.3.4. Лиганд 184
5.3.5. Конденсация 185
5.4. Адсорбция и элюирование 185
5.5. Общие приемы аффинной хроматографии 187
5.5.1. Иммобилизованные лектины 187
5.5.2. Иммобилизованные антитела 187
5.5.3. Иммобилизованные субстраты, ингибиторы и кофакторы ферментов 189

5.6. Примеры 190
5.6.1. Выделение и очистка антител 190
5.6.2. Очистка рецепторов гормонов 192
5.7. Стратегия очистки редких белков 195
Литература 195

Глава 6. Разделение смесей белков и пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 197

6.1. Введение 197
6.2. Гель-хроматография 198
6.2.1. Параметры разделения 199
6.2.2. Химические факторы 201
6.2.3. Определение истинных молекулярных масс 204
6.3. Адсорбция и распределение полипептидов и белков . . . 207
6.3.1. Подготовка к нанесению образца 213
6.3.2. Выбор колонки для обращенно-фазового разделения . . 214
6.3.3. Подвижная фаза 214
6.4. Обращенно-фазовое разделение пептидов 214
6.4.1. Выбор состава подвижной фазы 215
6.4.2. Выделение пептидов с использование фосфорной кислоты 217
6.4.3. Разделение пептидов с использованием трифтороуксусной и гептафторомасляной кислот 217
6.4.4. Корреляция между удерживанием и структурой . . . 217
6.5. Скоростная жидкостная хроматография белков 220
6.6. Ионный обмен 221
Литература 222

Глаав 7. Пептидное картирование белков 223

7.1. Введение 223
7.2. Пептидное картирование — типы анализируемых структур 225
7.3. Картирование пептидов на практике 226
7.3.1. Картирование по Кливленду 226
7.3.2. Двумерное картирование пептидов 231
7.3.3. Пептидное картирование с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии 235
7.4. Заключение 240
Литература 241

Глава 8. Аналитические методы 243

8.1. Введение 243
8.2. Стекло 244
8.3. Вода 245
8.4. Соляная кислота 245
8.5. Концентрирование растворов белков 246
8.5.1. Методики 248
8.6. Исчерпывающий гидролиз белков для аминокислотного анализа 249
8.6.1. Методики кислотного гидролиза 250
8.7. Триптофан 252
8.7.1. Определение триптофана после щелочного гидролиза белка 252
8.7.2. Определение триптофана после кислотного гидролиза белка 253
8.7.3. Определение триптофана в интактном белке 254
8.8. Остатки амидов дикарбоновых аминокислот 255
8.8.1. Методики определения амидов 255
8.9. Серусодержащие аминокислоты 257
8.9.1. Методы определения 257
8.10. Аргинин 260

8.10.1. Методы определения 260
8.11. Фосфорилированные аминокислоты 261
8.11.1. Гидролиз белка 261
8.11.2. Методы анализа 262
8.12. γ-Карбоксиглутаминовая кислота 264
8.12.1. Гидролиз белка 264
8.12.2. Методы анализа 265
8.13. Ацетильная и формильная группы 266
8.13.1. Определение ацетильных и формильных групп . . . 267
8.14. Обнаружение соединений при хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента 268
8.14.1. Флуоресцентные методы обнаружения 268
8.14.2. Обнаружение с помощью нингидрина 268
8.14.3. Смешанные методы обнаружения 269
8.15. Тонкослойная хроматография аминокислот 271
8.15.1. Методы разделения 271
8.16. Колоночная хроматография аминокислот 272
8.16.1. Колонки и буферы 272
8.16.2. Внутренние стандарты 275
8.16.3. Определение аминокислот 275
8.17. Газожидкостная хроматография аминокислот 285
8.17.1. Общая методика приготовления образцов 288
8.18. Количественное определение белка 290
8.18.1. Введение 290
8.18.2. Определение белка с помощью реактива Фолина — Чикольте 293
8.18.3. Определение белка с помощью биуретовой реакции . . 296
8.18.4. Определение белка с помощью кумасси бриллиантового голубого 297
8.18.5. Определение белка с помощью сульфобромофталеина 298
8.18.6. Определение белка с тринитробензолсульфокислотой в присутствии липидов 299
8.18.7. Метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии . . . 299
8.18.8. Спектрофотометрические методы 300
8.19. Методы окрашивания белков в гелях 302
8.19.1. Методы окрашивания белков красителями 304
8.19.2. Окрашивание белков комплексами серебра 305
8.20. Окрашивание белков на нитроцеллюлозной бумаге . . . 311
8.20.1. Окрашивание амидочерным 311
8.20.2. Окрашивание с помощью индийских чернил 311
8.20.3. Обнаружение с помощью антител 312
8.20.4. Обнаружение с помощью комплекса серебра и антител 312
8.21. Определение белка, присоединенного к твердому носителю 313
8.21.1. Белок, связанный с матрицей 314
8.21.2. Белок, связанный с сефарозой 314
8.21.3. Определение аминогрупп на твердом носителе . . . 315
8.21.4. Определение аминогрупп на гидрофильных матрицах . . 315
8.21.5. Определение аминогрупп реакцией с хлоранилом . . . 316
8.21.6. Определение природы заместителя на смоле по окрашиванию 316
8.21.7. Колориметрическое определение карбодиимидов . . . 316
8.21.8. Флуорометрическое определение карбодиимида . . . 317
8.22. Углеводсодержащие белки 317
8.22.1. Введение 317
8.22.2. Метилгликозид-триметилсилильный метод 318
8.22.3. Определение уроновых кислот, гексозаминов и галактозы гликозаминогликанов метилгликозид-триметилсилильным

методом 320
8.22.4. Чувствительный метилгликозид-триметилсилильный метод 320
8.22.5. Метод газовой хроматографии — масс-спектрометрии 321
8.22.6. Определение нейтральных сахаров и аминосахаров в виде альдитацетатов методом ГЖХ 321
8.22.7. Определение альдитов тонкослойной и газожидкостной хроматографией 321
8.22.8. Определение глюкозамина, галактозамина, триптофана и лизиноаланина на аминокислотном анализаторе . . . 322
8.22.9. Определение нейтральных сахаров и аминосахаров на аминокислотном анализаторе 323
8.23. Благодарности 323
Литература 323

Глава 9. Энантиомерный анализ смеси аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 334

9.1. Введение 334
9.2. Реагенты 335
9.2.1. Синтез N,N-ди-*н*-пропил-L-аланина 335
9.2.2. Растворы для ВЭЖХ 335
9.3. ВЭЖХ 336
9.3.1. Разделение на группы 337
9.3.2. Энантиомерный анализ 338
9.4. Заключение 340
Литература 341

Глава 10. Традиционная стратегия определения структуры белков . . 342

10.1. Введение 342
10.2. Выбор стратегии исследования 344
10.3. Ферментативный гидролиз 349
10.4. Фракционирование растворимых пептидов 351
10.4.1. Гель-фильтрация 353
10.4.2. Хроматография на колонке с дауэксом-50 355
10.4.3. Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой . . . 356
10.4.4. Высоковольтный электрофорез и хроматография на бумаге 356
10.5. Фракционирование нерастворимых пептидов 357
10.6. Контроль гомогенности и определение аминокислотной последовательности пептидов 357
10.7. Реконструкция полипептидной цепи 359
10.8. Методики 360
10.8.1. Аналитические электрофорез и хроматография на бумаге 360
10.8.2. Препаративные электрофорез и хроматография на бумаге 361
10.8.3. Окрашивание пептидов 363
10.8.4. Элюирование пептидов 363
Литература 364

Глава 11. Определение аминокислотной последовательности пептидов по методу Эдмана с идентификацией дансиламинокислот . . 366

11.1. Введение 366
11.2. Дансилирование 366
11.2.1. Методика дансилирования 369
11.3. Конденсация и расщепление по Эдману 370
11.3.1. Деградация по Эдману. Методика 372
Литература 373

Глава 12. Методы твердофазного анализа аминокислотной последовательности . . . 374

12.1. Введение . . . 374
12.2. Материалы . . . 375
12.2.1. Растворители . . . 375
12.2.2. Реагенты . . . 377
12.2.3. Стеклянные шарики для разбавления навески полимеров 377
12.2.4. Носители . . . 377
12.2.5. Буферы для присоединения . . . 378
12.2.6. Растворы реагентов и буферов для секвенатора . . . 378
12.3. Синтез смол . . . 379
12.3.1. Смолы на основе полистирола . . . 379
12.3.2. Носители на основе стекла . . . 382
12.3.3. Определение содержания аминогрупп в носителях на основе органических полимеров или пористых стекол . . . 385
12.4. Методы присоединения . . . 386
12.4.1. Присоединение лизилсодержащих пептидов с помощью ДИТЦ . . . 386
12.4.2. ДИТЦ-метод с использованием изотиоцианатного стекла 389
12.4.3. Присоединение по лактону гомосерина . . . 390
12.4.4. Присоединение по карбоксилу при помощи карбодиимида 391
12.4.5. Контроль степени присоединения . . . 392
12.5. Отщепление на твердофазном секвенаторе . . . 393
12.5.1. Колонка . . . 393
12.5.2. Упаковка колонки . . . 394
12.5.3. Программа работы секвенатора . . . 394
12.5.4. Рекация карбамоилирования . . . 394
12.5.5. Растворители . . . 395
12.5.6. Отщепление анилинотиазолинона . . . 395
12.5.7. Перегруппировка анилинотиазолинона в ФТГ . . . 395
12.6. Обсуждение . . . 399
12.6.1. Твердофазный анализ небольших пептидов . . . 399
12.6.2. Твердофазный анализ крупных пептидов и белков . . 400
12.6.3. Сравнение жидкофазного и твердофазного методов . . 401
12.6.4. Анализ структуры на микроуровне . . . 401
Литература . . . 403

Глава 13. Анализ фенилтиогидантоинов аминокислот . . . 405

13.1. Введение . . . 405
13.2. Аналитические методы . . . 406
13.2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография . . . 406
13.2.2. Газожидкостная хроматография . . . 417
13.2.3. Тонкослойная хроматография . . . 417
13.2.4. Обратный гидролиз ФТГ-производных аминокислот . . 418
Литература . . . 418

Глава 14. Определение аминокислотной последовательности пептидов с использованием 4-диметиламиноазобензол-4′-изотиоцианата (в ручном варианте) . . . 419

14.1. Введение . . . 419
14.2. Реагенты и растворители . . . 419
14.3. ДАБИТЦ — ФИТЦ-методика в жидкофазном варианте . . 420
14.4. ДАБИТЦ — ФИТЦ-методика в твердофазном варианте . . 420
14.5. Превращение тиазолинонов аминокислот в тиогидантоины 421
14.6. Идентификация ДАБТГ-аминокислот . . . 421
14.6.1. Тонкослойная хроматография . . . 421

14.6.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография . . . 423
14.7. Заключение 423
Литература 424

Глава 15. Современное состояние автоматического жидкофазного анализа аминокислотной последовательности 425

15.1. Введение 425
15.2. Подготовка образца 425
15.3. Сравнение квадрола с летучими буферами 428
15.4. Полибрен 430
15.5. Реагенты и растворители 430
15.6. Основные проблемы, возникающие при использовании автоматического секвенатора 432
15.6.1. Вакуумная система 432
15.6.2. Утечки в вакуумной линии в системе с одним насосом 433
15.6.3. Программирующее устройство 433
15.6.4. Реле 433
15.6.5. Клапаны 434
15.7. Контроль качества работы прибора 434
Литература 435

Глава 16. Новейшие методы твердофазного и жидкофазного определения аминокислотной последовательности 437

16.1. Введение 437
16.2. Твердофазный анализ. Новейшие подходы 437
16.2.1. Общие замечания 437
16.2.2. Носители 439
16.2.3. Присоединение пептидов к носителям и «забивка» оставшихся реакционных центров носителя 443
16.2.4. Отщепление по Эдману 448
16.2.5. Другие методы последовательного отщепления . . . 453
16.3. Автоматический жидкофазный анализ. Усовершенствованные методики 456
16.3.1. Анализ белков и больших пептидов на обычном уровне 456
16.3.2. Анализ последовательности аминокислот небольших и гидрофобных пептидов 457
16.3.3. Анализ на микроуровне 458
16.4. Заключение 460
Литература 460

Глава 17. Анализ аминокислотной последовательности на микроуровне с использованием газофазного пептидно-белкового секвенатора 464

17.1. Введение 464
17.2. Секвенатор 465
17.2.1. Реактор 467
17.2.2. Реагенты и растворители 467
17.2.3. Эксплуатация секвенатора 467
17.3. Очистка полипептида для микроанализа 471
17.3.1. Реактивы и материалы 472
17.3.2. Аппаратура и методика 473
17.4. Обсуждение 474
17.4.1. Иммобилизация образца и чувствительность прибора 474
17.4.2. Химические аспекты 477
17.4.3. Количество анализируемого образца 477
17.4.4. Прогнозы 478
Литература 479

Глава 18. Определение С-концевой последовательности аминокислот 481

18.1. Введение 481
18.2. Выделение и идентификация С-концевых пептидов . . . 482
18.2.1. Методики ионообменной хроматографии 482
18.2.2. Твердофазные смолы 483
18.2.3. Двумерное пептидное картирование 484
18.3. Определение С-концевых групп 487
18.3.1. Селективное введение трития 488
18.3.2. Гидразинолиз 493
18.3.3. Селективное восстановление 496
18.3.4. Определение С-концевых аминокислот в виде альдегидов 497
18.3.5. Определение С-концевых аминокислот путем алкоголиза оксазолов 499
18.4. Определение С-концевой последовательности 501
18.4.1. Расщепление при помощи тиоцианата 501
18.4.2. Расщепление при помощи цианамида 504
18.4.3. Другие химические методы расщепления 506
18.4.4. Карбоксипептидазы 507
18.5. Заключение 511
Литература 512

Глава 19. Применение масс-спектрометрии электронного удара для определения аминокислотной последовательности пептидов и белков 515

19.1. Введение 515
19.2. Требования к анализируемым пептидам 515
19.2.1. Размеры молекул 515
19.2.2. Количество пробы 516
19.2.3. Чистота образцов 516
19.3. Требования к аналитическим приборам 516
19.4. Способы подготовки проб 517
19.4.1. Очистка реактивов 517
19.4.2. Лабораторная посуда 519
19.4.3. Гидразинолиз 519
19.4.4. Ацетилирование 519
19.4.5. Перметилирование 519
19.4.6. Запись масс-спектров 520
19.5. Общие принципы масс-спектрометрического определения аминокислотной последовательности пептидов и белков . . . 520
19.6. Интерпретация масс-спектров 523
19.6.1. Введение 523
19.6.2. Пути фрагментации пептидов 523
19.6.3. Введение ^{2}H-метки 525
19.7. Особые случаи применения метода 526
19.7.1. Пептиды с защищенной N-концевой аминогруппой . . 526
19.7.2. Определение N-концевой аминокислотной последовательности 526
19.7.3. Белки, содержащие остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты 527
19.8. Заключение 527
Литература 528

Глава 20. Рентгеновская кристаллография и электронная микроскопия 530

20.1. Дифракция рентгеновских лучей 530
20.1.1. Введение 530
20.1.2. Получение изображений молекул — разновидность структурного анализа 530

20.1.3. Принципы определения структуры в рентгеноструктурном анализе 532
20.1.4. Кристаллография белков 533
20.1.5. Конструирование моделей 544
20.1.6. Конструирование моделей с помощью средств компьютерной графики 545
20.2. Электронная микроскопия 546
20.2.1. Введение 546
20.2.2. Разрешение и ограничения метода 547
20.2.3. Электронный микроскоп 549
20.2.4. Технические проблемы 550
20.2.5. Подготовка образцов и их «окрашивание» 551
20.2.6. Обработка изображений 554
20.2.7. Трехмерная электронная микроскопия 555
20.2.8. Молекулярная микроскопия 557
Литература 558

Глава 21. Предсказание конформаций пептидов и белков 559

21.1. Введение 559
21.2. Традиционные методы 560
21.3. Недостатки традиционных методов 565
21.4. Арсенал современных теоретических методов 566
21.4.1. Квантовомеханические методы 568
21.4.2. Метод молекулярной динамики 571
21.4.3. Метод Монте-Карло 573
21.4.4. Статистическая механика 577
21.4.5. Минимизация 578
21.4.6. Жесткая геометрия 580
21.4.7. Периодическое оценивание и картирование 581
21.4.8. Эвристические методы 582
21.5. Предсказание вторичной структуры. Специальный тип расчетов 585
21.6. Исходные предпосылки расчетов 588
21.6.1. Проверка потенциальных функций, полученных на основе кристаллографических данных, с помощью простых приближенных методов 591
21.6.2. Проверка потенциальных функций, полученных из структурных данных, с помощью более точных методов . . 593
21.6.3. Попытки предсказания третичной структуры глобулярных белков 595
21.7. Современное состояние предсказательных методов . . . 599
Литература 602
Предметный указатель 605